UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIRESORTIVO DE NAC EN CÉLULAS SIMILARES A OSTEOCLASTOS OBTENIDAS POR FUSIÓN CON PEG O POR FUERZA CENTRIFUGA.

PEDRO JOSÉ MORENO BELTRÁN

Universidad Nacional De Colombia

Facultad de Medicina

Departamento de ciencias fisiológicas

Maestría En Bioquímica

Bogotá; Colombia 2017

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIRESORTIVO DE NAC EN CÉLULAS SIMILARES A OSTEOCLASTOS OBTENIDAS POR FUSIÓN CON PEG O POR FUERZA CENTRIFUGA.

PEDRO JOSÉ MORENO BELTRÁN

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

MAGISTER EN BIOQUÍMICA

DIRECTOR: CARLOS ARTURO GUERRERO FONSECA MD. MSC. PHD

Línea de Investigación: Metabolismo Óseo

Universidad Nacional De Colombia

Facultad de Medicina

Departamento de ciencias fisiológicas

Maestría en Bioquímica Bogotá 2017

A la memoria de mi madre y su tesoro más preciado: Juan Carlos y Diego Alejandro.

AGRADECIMIENTOS

A Diego Alejandro Moreno Beltrán quien ha cubierto muchos gastos de mi manutención, así como financiar mi viaje a la ciudad de Boston para poder participar en el IADR 2015.

Al comité de la maestría en bioquímica de la facultad de medicina de la Universidad Nacional De Colombia por darme la oportunidad de ingresar a la maestría, pese a mi nula experiencia en investigación. Gracias por sus oportunas y acertadas críticas.

Al doctor Carlos Guerrero quien me dio la oportunidad de realizar la tesis en su grupo de investigación, por todas las noches y fines de semana en los cuales me apoyo y guio tanto en la planeación como en la realización de los experimentos, así mismo por su paciencia, critica, preocupación por mi aprendizaje y formación.

A Odie por todo lo que me enseño y compartió durante su vida.

A los que fueron, son y serán; Ángela, Casper, Manuel, Kikin, Lilia, Leidy.

A las personas que siempre han estado a mi lado sin ningún interés, Angie, Blanca, Teresa B, Víctor, Diego F, Lina M, Victoria R, Diana O, Janeth, Jessica S, Liliana y Camila.

A José Luis, Beatriz y Miguel por ser tan buenos y críticos compañeros.

A Miguel Ospino por todo su apoyo técnico en el laboratorio.

Resumen

Previamente mostramos que la fusión inducida con Polietilenglicol (PEG) de macrófagos tanto de las líneas U937/A y J774 conducía a la diferenciación y activación de osteoclastos de acuerdo con la expresión de marcadores de osteoclastos como la fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP) y la actividad de resorción ósea, por otro lado al someter células de fibroblastos gingivales a fuerzas centrifugas se observó marcadores osteoclásticos como presencia TRAP y actividad resortiva. Se ha identificado que para que suceda la diferenciación hacia osteoclasto es necesario el aumento de las concentraciones intracelulares de especies reactivas de oxigeno (ROS). En el momento no hay un modelo experimental que explique el papel de ROS en la diferenciación osteoclástica cuando se aplican fuerzas como en los tratamientos de ortodoncia. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto antiresortivo de NAC (n acetil cisteina) en células similares a osteoclastos obtenidas por fusión con PEG o en células sometidas a fuerzas centrifugas.

Células U937 fueron sembradas sobre láminas de hueso cortical de origen bovino y sometidas a fuerzas compresivas. Paralelamente otra fracción de células se fusionó con PEG 1450 y a otra porción no se les aplicó ningún tratamiento y fueron cultivadas en similares condiciones (grupo control), los grupos expuestos anteriormente fueron tratados o no con 30 mM del fármaco anti-oxidante N-acetil cisteína (NAC), se evaluó la actividad TRAP, la actividad resortiva ósea, la presencia de anillos de actina por medio de fluorescencia indiceta, y la expresión de marcadores poblacionales exclusivos de osteoclastos por medio de inmunofluorescencia indirecta. Los niveles ROS fueron evaluados mediante el reactivo DHE (Hydroethidine), la fusión celular se evaluó mediante el uso de los marcadores DiD y DiO. La diferencia de los grupos de los tratamientos fue analizada por el método de ANOVA de doble vía. Para evaluar el grado de correlación entre las variables se realizó una prueba de correlación de Tuquey.

Encontramos que la fusión celular *per se*, de células U937, con PEG 1450 o al aplicar fuerza compresiva, induce características similares a la de los osteoclastos como generar anillos de actina, aumentar la actividad ROS, formar células multinucleadas TRAP positivas, aumentar la expresión de NF-κB, así como, el de marcadores poblacionales

característicos evaluados, al aumentar la actividad de resorción en láminas de hueso cortical bovino. Sin embargo, los patrones de resorción y de fusión son diferentes al tratar con PEG o someter a fuerzas compresivas. Al tratar estas mismas células con 30mM de NAC todos los efectos se revirtieron observándose diferencias altamente significativas $P<0.001$.

Fusionar células con PEG o someterlas a fuerza centrífuga genera estrés oxidativo (producción de ROS) lo cual activa vías relacionadas con la maduración del osteoclasto (anillos de actina TRAP, resorción y marcadores característicos de los osteoclastos). Al aplicar reductores probablemente disminuye la actividad o la maduración de estas células.

Palabras claves: osteoclasto, poli etilenglicol, fuerza centrífuga, especies reactivas de oxígeno, N-acetyl cisteína.

Abstract

We previously, showed that the macrophages fusion induced with Polyethylene glycol (PEG) both of U937/A and J774 lines, led to the differentiation and activation of the osteoclasts according to the expression of the osteoclast markers such as the acid phosphatase resistant to tartrate (TRAP), and the activity of bone resorption, moreover, when submitting the gingival fibroblasts cells to centrifugal forces, osteoclastic markers were observed as a TRAP presence and resorptive activity. It has been identified that, in order for the differentiation towards the osteoclast to take place, it is necessary to increase the intracellular concentrations of reactive oxygen species (ROS). At the moment, there is no any experimental model that explains the role of the ROS in osteoclastic differentiation when forces are applied as it's done in orthodontic treatments. The objective of this work was to evaluate the anti-resorptive effect of NAC (N-Acetylcysteine) in cells that are similar to the osteoclasts obtained by fusion with PEG (polyethylene glycol) or in cells submitted to centrifugal forces.

The U937 cells were seeded on sheets of bovine origin cortical bone, and submitted to compressive forces. At the same time, another fraction of cells were fused with polyethylene glicol PEG 1450 and to another one more no treatment was applied; both of them were seeded in similar conditions (control group). The groups exposed above, were treated or non treated with 30 mM of the antioxidant drug N-acetyl cysteine (NAC); the TRAP activity, the bone resorptive activity, the presence of actin rings through indirect fluorescence, and the expression of population markers exclusive to osteoclasts through indirect immunofluorescence were evaluated. The ROS levels were evaluated by means of the DHE (Hydroethidine) reagent; the cellular fusion was evaluated through the use of DiD and DiO markers. The difference between the treatment groups was analized by the two-way ANOVA method. A Tukey correlation test was performed to evaluate the degree of correlation between the variables.

We found that cellular fusión *per se*, of U937 cells that are chemically fused with PEG 1450, or the application of compressive force, induce features similar to those of the osteoclasts, such as generating actin rings; increasing the ROS activity; forming positive multinucleated TRAP cells; increasing the expression of NF-κB as well as the one of

population markers, distinctive of osteoclasts; and increasing the activity of resorption in sheets of bovine cortical bone. However, resorption and fusion patterns are different when dealing with PEG or submitting to compressive forces. When these experimental groups were treated with 30 mM of NAC, all the effects were reversed, and highly significant differences of $P<0.001$were observed.

Fusing cells with PEG o submitting them to a centrifuge force, genarates oxidative stress (ROS production) which activates the pathways related to osteoclast maturation (TRAP actin rings, resorption and markers distinctive of osteoclasts). When applying reducers, probably the activity or the maturation of these cells is reduced.

Keywork; osteoclasts, polyethilene glicol, reactive oxygen species, N-acetylcysteine, centrifuge force.

Tabla de contenido

TABLA DE FIGURAS 11
INTRODUCCIÓN 13
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 14
2. JUSTIFICACIÓN 16
3. OBJETIVO GENERAL 17
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 17
4. MARCO TEÓRICO 18
5.1 DIFERENCIACIÓN OSTEOCLÁSTICA 19
5.1.1 RANK/RANKL/OPG 20
5.1.2 VÍA DE SEÑALIZACIÓN RANK EN OSTEOCLASTOS 20
5.2 FUSIÓN OSTEOCLÁSTICA 21
5.2.1 SYNCYTIN-1 22
5.2.2. MRF/SIRPα-CD47 22
5.2.3 DC-STAMP 23
5.2.4 OC-STAMP 24
5.2.5 DC-STAMP y OC-STAMP 25
5.3 QUIMIOTAXIS y FUSIÓN 25
5.4 OBTENCIÓN DE CÉLULAS SIMILARES A OSTEOCLASTOS POR PEG 26
5.5 FUERZAS EN OSTEOCLASTO 28
5.6 ROS 31
5.7 NAC 31
5. MÉTODOS 33
6.1 Láminas de hueso 33
6.2 Fusión con PEG 33
6.3 Células U937 fuerzas compresivas 34
6.4 Siembra y Tratamiento con NAC 34
6.5 Evaluación niveles ROS 34
6.6 Evaluación de la expresión de Fosfatasa ácida resistente a Tartrato (TRAP). 35
6.7 Evaluación De La Actividad Resortiva. 35

6.8 ANÁLISIS DE MARCADORES OSTEOCLÁSTICOS 36
6.8.1 Evaluación de fusión 36
6.8.2 Inmunofluorescencia Indirecta 37
6.8.3 Evaluación de Anillos de Actina. 38
6.9 Análisis estadístico 38
7. RESULTADOS 40
7.1 EVALUACIÓN NIVELES ROS 40
..... 42
7.2 EVALUACIÓN DE FUSIÓN 43
7.3 EVALUACIÓN EXPRESIÓN TRAP 46
7.4 EVALUACIÓN ACTIVIDAD ANTIRESORTIVA DE NAC 49
7.5 EVALUACIÓN DE PONDOSOMAS 51
7.6 DETERMINACIÓN MARCADORES POBLACIONALES 53
7.6.1 ANHIDRASA CARBONICA 53
7.6.2 DC-STAMP 55
7.6.3 RECEPTOR CALCITONINA 57
7.6.4 INTEGRINA β3 59
7.6.5 MMP-9 62
7.6.6 CATEPSINA K 64
7.6.7 SUBUNIDAD C1 DE LA ATPASA VACUOLAR H^+ VI (ATPC1) 66
7.6.8 ADAM 12 69
7.6.9 NFKβ-p 71
8. DISCUSIÓN 74
9. CONCLUSIONES 80
10. PERSPECTIVAS 81
11. BIBLIOGRAFÍA 82
A. ANEXOS 93

TABLA DE FIGURAS

Figura 1 Evaluación actividad ROS de células U937 41

figura 2 Evaluación de fusión de células U937..... 44

Figura 3 Evaluación de la expresión de la enzima TRAP..... 47

Figura 4 Actividad resortiva células U937 50

figura 5 Anillos de actina ..... Error! Bookmark not defined.

figura 6 Inmunofluorescencia para anhidrasa carbónica... Error! Bookmark not defined.

Figura 7 Inmunofluorescencia para DC-STAMP..... Error! Bookmark not defined.

Figura 8 Inmunofluorescencia para receptor de calcitonina..... 59

Figura 9 Inmunofluorescencia para integrina β3 61

Figura 10 Inmunofluorescencia para MMP-9 63

Figura 11 Inmunofluorescencia para Catepsina K 65

Figura 12 Inmunofluorescencia para ATPC1..... 68

Figura 13 Inmunofluorescencia para ADAM 12 70

Figura 14 Inmunofluorescencia para NFKβ-p 73

INTRODUCCIÓN

El osteoclasto es la célula multinucleada TRAP (fosfatasa acida resistente a tartrato) positiva formada por la fusión de progenitores mononucleares del linaje monocito macrófago[1], juega un papel central en la formación del esqueleto regulando su masa y su forma. La resorción ósea es una actividad elemental celular para modelar el esqueleto en crecimiento y desarrollo, durante el remodelado la resorción ósea está acompañado de la formación de nuevo hueso que asegura la renovación del tejido óseo con una poca pérdida de sustancia[2].

Una vez formado el policarión en el sitio de la resorción este se une a la matriz mineralizada, esta unión implica la organización de los anillos de actina y la formación de la zona de selle, la polarización de la membrana y la formación de dos dominios específicos: el borde en forma de cepillo y un dominio secretorio funcional. La resorción ósea incluye la disolución de cristales de hidroxiapatita, fragmentación de las fibras de colágeno y otras proteínas de la laguna de resorción, la remoción de estos productos de resorción al dominio funcional secretor se da por transcitosis y este dominio libera los productos a la circulación. Por último la célula se despolariza reorganizando su citoesqueleto para ir a un nuevo lugar de resorción o a apoptosis[3].

Fundamentalmente las alteraciones biomecánicas de la pulpa dental, ligamento periodontal, hueso alveolar y gingiva son requeridos para el proceso de movimiento ortodóntico, la importancia de este es la conversión de fuerzas mecánicas a señales biológicas que permitan el movimiento dental. Las fuerzas aplicadas inmediatamente inducen la tensión en la matriz de los fibroblastos de ligamento periodontal (FLP) cambiando el flujo del fluido crevicular en el ligamento y en el hueso, trayendo como consecuencia que un lado de FLP es comprimido (zona de compresión) y el lado opuesto es tensionado (zona de tensión), por los propioceptores mecanosensitivos de osteocitos, FLP y osteoclastos. La resorción ósea es llevada a cabo en las zonas de compresión y la formación ósea es realizada en las zonas de tensión, la forma como estas cargas mecánicas están relacionadas con una respuesta biológica es prácticamente desconocida. [4,5]

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha reportado un aumento de las ROS (especies reactivas de oxígeno) en células derivadas de medula ósea inducidas a osteoclastogénesis, al tratamiento con 30mM de NAC durante 5 días de inducción de la diferenciación se observa disminución en el número de células TRAP positivas al igual que en las lagunas de resorción comparadas con las células no tratadas con NAC[6], En otro modelo experimental al silenciar la TRP14 (proteína de 14 KDA similar a la theoredoxina) en células de medula ósea inducidas a diferenciación osteoclástica se observó un aumento tanto de ROS como del potencial resortivo de los osteoclastos[7], sugiriendo una relación directa entre osteoclastogénesis y el aumento de ROS en sus precursores.

Al evaluar el efecto de NAC en la diferenciación hacia osteoclasto, se determinó que NAC ejerce un efecto antioxidante en células de medula ósea llevadas a diferenciación osteoclástica por el aumento de la síntesis de glutatión y la disminución de la concentración intracelular de H2O2 disminuyendo el porcentaje de células apoptóticas,[8] en células mesenquimales en medio de cultivo osteoblastogénico, se observó un aumento en la detección de marcadores osteoblásticos en las células pretratadas con 10mM de NAC frente a las células no expuestas a NAC[9,10] y en células de calvaría murina llevadas a diferenciación osteoblástica, [11] Este efecto se podría atribuir a la sobreexpresión de Wnt5a y la expresión a la baja de PPAR-δ en células de medula ósea llevadas a diferenciación osteoblástica.[10]

En modelos in-vivo se ha observado que NAC es capaz de disminuir la pérdida ósea que se observa en periodontitis inducida en ratas, sin importar cómo se induzca la periodontitis; ya sea por retención de placa dento bacteriana[12] o por la inducción de diabetes en ratas.[13] Al tratar fibroblastos gingivales con lipopolisacaridos de *E. Coli* se observa un aumento de las concentraciones de especies reactivas de oxigeno (ROS) acompañado de la expresión de citoquinas inflamatorias, este efecto fue disminuido por el tratamiento de 20mM de NAC, sugiriendo que el efecto de la disminución en la pérdida ósea alveolar en periodontitis observado en ratas sea por la disminución de ROS en los fibroblastos del ligamento periodontal y gingivales.[14]

En otro trabajo reportado que utilizo fuerzas compresivas se centrifugo fibroblastos de ligamento periodontal por 1,4,6 horas a 127gravedades (30.3 g/cm2) en un rotor (Beckman GH3.7), se determinó que estas células al ser sometidas a fuerzas de compresión aumentan los niveles de mensajero de Ephrin-A2[15] una proteína que se ha descrito como clave en la activación de la diferenciación osteoclástica,[16] sugiriendo que los fibroblastos de ligamento periodontal pueden inducir la osteoclastogénesis ante fuerzas compresivas. Soportando este resultado está el trabajo de Pazos y Guerrero en el 2013 quienes al someter fibroblastos gingivales a fuerzas compresivas (0.92g/cm2) durante 5 días observaron actividad resortiva y células TRAP+ multinucleadas, como control se fusionaron células con PEG y se observó el mismo resultado [17].

Si bien ningún estudio ha examinado los niveles de ROS en células con capacidad de diferenciarse hacia osteoclastos ante fuerzas compresivas, ni el efecto que tendría un antioxidante como NAC en células con potencial de diferenciación osteoclástica a someterlas a fuerzas compresivas, [18] [19] en este trabajo se determinaron los niveles ROS luego de fusionar células U937 con PEG o someterlas a fuerza centrífuga y tratarlas con NAC. Igualmente se comparará la actividad resortiva de células U937 fusionadas con PEG o sometidas a fuerzas centrífugas y tratadas con NAC, evaluando la expresión de marcadores característicos de células osteoclásticas luego de fusionarlas con PEG o someterlas a fuerza centrífuga y tratarlas con NAC.

2. JUSTIFICACIÓN

Es importante estudiar la actividad resortiva luego de aplicar fuerzas tensiles como las aplicadas en la ortodoncia y distracciones óseas, que permita explicar la resorción que generalmente se presenta. En el momento no hay ningún modelo experimental que permita evaluar los posibles cambios bioquímicos y morfológicos en células con potencial de diferenciación hacia osteoclasto sometidas a fuerzas compresivas constantes y de baja magnitud. Tampoco es claro aún si la resorción ósea observada ante las fuerzas de compresión sea regulada por el aumento en la concentración celular de especies reactivas de oxigeno (ROS) como se ha observado en osteoclastos obtenidos por tratamiento con hormonas y citoquinas.[20]

Ya que las células U937 fusionadas con PEG tienen actividad resortiva, son TRAP+ y presentan marcadores poblacionales característicos de osteoclastos[18] permitirá compararlas con células U937 sometidas a fuerzas compresivas y así determinar si estas últimas tienen potencial de diferenciación hacia célula similar a osteoclasto.

Evaluar los niveles ROS de los modelos experimentales propuestos (fusión con PEG, fuerzas compresivas) y determinar si estos son críticos para que las células U937 bajo estas condiciones alcancen características osteoclásticas, permitirá proponer el uso de estrategias reductoras in vitro e in vivo. Igualmente, permitirá validar estas dos alternativas experimentales (fusión con PEG, fuerzas compresivas) como modelos de estudio en la fisiología de radicales libres en la homeostasis ósea.

Al determinar que NAC disminuye o impide la actividad resortiva inducida por fuerzas tensiles o por fusión con PEG permitirá proponer en un futuro a NAC como parte del tratamiento preventivo de recidiva en tratamientos de ortodoncia y cirugías ortognaticas.

3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antiresortivo de NAC en células similares a osteoclastos obtenidas por fusión con PEG o en células sometidas a fuerzas centrifugas.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar los niveles ROS luego de fusionar células U937 con PEG o someterlas a fuerza centrífuga y tratarlas con NAC.

Comparar la actividad resortiva de células U937 fusionadas con PEG o sometidas a fuerzas centrífugas y tratadas con NAC.

Evaluar la expresión de marcadores característicos de células osteoclástica luego de fusionar células U937 con PEG o someterlas a fuerza centrífuga y tratarlas con NAC.

4. MARCO TEÓRICO

Histológicamente el hueso tiene dos tipos de tejido: óseo cortical (compacto) y trabecular (esponjoso), el hueso compacto comprende el 80% del volumen en un esqueleto adulto y el hueso trabecular el 20% restante, el hueso cortical en todo tipo de hueso forma una cascara periférica construido por osteonas de un canal central de Havers con vasos sanguíneos y fibras nerviosas rodeadas por tejido óseo en capas paralelas concéntricas. El hueso trabecular forma espacios en el interior de algunas partes del esqueleto, las vértebras, huesos planos en el cráneo, la pelvis, sacro, las partes proximal y distal de los hueso largos son ricos en hueso trabecular, tanto el hueso trabecular como el hueso compacto son importantes para la resistencia, el interior del hueso contiene medula ósea que comprende tejido hematopoyético [21].

El tejido óseo es continuamente reconstruido para adaptarse a requerimientos externos y para renovar la matriz extracelular, en el esqueleto adulto el hueso cortical y trabecular es reconstruido por dos procesos llamados modelado (modeling) y remodelado (remodeling)[22]. El modelado óseo es un proceso de cambios de tamaño y forma del hueso por reabsorción sin subsecuente formación ósea o formación ósea sin previa reabsorción, el remodelado óseo es el proceso por el cual el hueso averiado o viejo es intercambiado por nuevo hueso, el remodelado es iniciado por la resorción de hueso lesionado seguido por la nueva formación ósea en el área reabsorbida, el remodelado no cambia la forma y tamaño del hueso, es más frecuente en hueso trabecular que en hueso cortical una de las razones por la cual la osteoporosis afecta primariamente huesos con más porcentaje de tejido trabecular por ejemplo: vertebras, radio distal y fémur proximal [21].

Se ha sugerido que microfisuras en el hueso y la posterior apoptosis de osteocitos activan células del proceso de remodelación para estimular la formación de osteoclastos y la resorción ósea de la zona microdañada, durante el proceso de reabsorción factores de crecimiento son liberados en el hueso que se anclan y activan al osteoblasto para formar nuevo hueso, cuando la cantidad de hueso reabsorbido y aposicionado es la misma la masa

ósea se mantiene constante, este equilibrio involucra interacciones bidireccionales entre osteoclastos y osteoblastos [23].

5.1 DIFERENCIACIÓN OSTEOCLÁSTICA

El osteoclasto es un policarión derivado de la diferenciación de precursores monocito macrófago, cerca o en la superficie ósea, el contacto entre la medula ósea y el estroma es esencial para la osteoclastogénesis, y sugiere que del estroma se derivan factores para este proceso. Este sistema permite la producción de 2 factores hematopoyéticos que son necesarios y suficientes para la osteoclastogénesis, RANKL y CSF-1 (factor estimulador de colonias-1), y por la subsecuente activación de RANK en la superficie del precursor celular, tanto CSF-1 como RANK son requeridos para inducir la expresión de genes que tipifican el linaje osteoclastogénico, incluyendo TRAP, Catepsina K (CATK), el receptor de la calcitonina e integrina β-3.[24]

Para que el osteoclasto sea polarizado este debe realizar cambios estructurales internos que le permitirán realizar la resorción ósea, esto comprende la reorganización del cito esqueleto de actina y la formación de una delgada unión entre la superficie ósea con la membrana basal para formar un compartimiento sellado[25]. Este espacio es después acidificado por la exportación de iones hidrogeno generados por bomba ATP vacuolar, la secreción continua así como la exportación de enzimas líticas como TRAP y pro-CATK en las lagunas de resorción, a través de este proceso el osteoclasto erosiona el hueso subyacente degradando productos (fibras de colágeno, calcio y fosfato soluble) que son procesados dentro del osteoclasto y liberados en la circualacion.[26,25]

Algunos genes actúan durante la formación y o supervivencia del precursor celular del osteoclasto (PU.1 y CSF-1), mientras otros median tanto la habilidad del precursor para diferenciarse (RANK, p50/p52 Y C-Fos) o la función de adherencia y lisis del osteoclasto maduro (src y CATK) [27].

5.1.1 RANK/RANKL/OPG

Un avance para el entendimiento de cómo está regulada la osteoclastogénesis fue la identificación de OPG, esta proteína soluble bloquea la formación de osteoclastos in vitro y la resorción ósea in-vivo[28], OPG es una proteína relacionada con TNFR que regula la densidad ósea en animales y administrándose sistémicamente puede bloquear la resorción patológica en varios modelos experimentales animales[29], su actividad bioquímica se atribuye a poseer dominios de unión de OPG a TNFR, la proteína de superficie relacionada con TNFR RANKL ha sido identificada como un citoquina clave en la regulación de la osteoclastogénesis y la resorción ósea, posteriormente se evidencio que RANKL puede unirse y activar a RANK un receptor de superficie transmenbranal[30].

La expresión de RANK en los precursores hematopoyéticos es requerida en osteoclastos murinos para la diferenciación y activación de la resorción ósea así como para la homeostasis del calcio y hormonas calcitropicas, ratones deficientes en RANK o RANKL son fenotípicamente iguales entre sí, lo que indica el papel esencial de este sistema ligando-receptor en la remodelación ósea.[31,32]

RANKL es un polipéptido transmembranal tipo II encontrado en la superficie celular así como en forma soluble,[33] hormonas y factores que estimulan la resorción ósea en vivo inducen la expresión de RANKL en células de medula ósea,[34] la expresión de RANKL por osteoclastos coordina el remodelado óseo por estimular la resorción por osteoclastos que en cambio estimulan la síntesis ósea por osteoblastos adyacentes por un proceso denominado (coupling)[35], OPG actúa de hecho como un receptor señuelo para bloquear la unión de RANKL a al receptor celular RANK, es producido en osteoblastos en respuesta a agentes anabólicos como estrógenos y el factor de crecimiento estimulante-β (TGF-β), su sobre expresión bloquea la producción de osteoclastos.[35, 36]

5.1.2 VÍA DE SEÑALIZACIÓN RANK EN OSTEOCLASTOS

La activación de RANK por su ligando permite la expresión de genes específicos de osteoclastos durante la diferenciación, activación de la resorción por osteoclastos maduros, supervivencia y participación en la síntesis de nuevo tejido óseo,[37] RANK estimula factores citoplasmáticos que activan vías de señalización corriente abajo que controlan varias funciones.[38] Se han identificado 5 quinasas que son inducidas durante la osteoclastogénesis: inhibidor de la quinasa NF-kB (IKK), c-Jun N-terminal quinasa (JNK), p38, quinasa reguladora de señales extra celulares (ERK) y la vía Src. El paso clave preliminar en la vía de RANK es la unión de los factores citoplasmáticos asociados a TNRF (TRAF) a dominios específicos de RANK. [37,38] TRAF2, 5 y 6 se unen a RANK, TRAF6 actúa como adaptador para ensamblar proteínas de señalización que dirigen la expresión génica de los osteoclastos conduciendo a la diferenciación y activación.[39]

Las dos vías más estudiadas son la activación de los factores de transcripción NF-kB y el activador de la proteina-1 (AP-1), la mutagénesis dirigida a el componente p50/p52 de NFkB, como también a cFos componente de AP-1, resulta en osteopetrosis al bloquear la osteoclastogénesis, estos factores de transcripción pueden ser inducidos por proteínas quinasas que incluyen: IKK 1 / 2 (NFkB) y JNK1 (AP-1).[40]

5.2 FUSIÓN OSTEOCLÁSTICA

La fusión celular es una propiedad básica de organismos multicelulares con una amplia significancia biológica, la fusión célula – célula en mamíferos es esencial para la fertilización (fusión del espermatozoide con el ovulo), para la formación de musculo esquelético (fusión de mioblasto) y placenta (fusión de tropoblastos). La fusión de células del linaje monocito/macrófago permite la maduración de osteoclastos y células gigantes (FBGC; foreign body giant cells) [41].

Se sugiere que la cantidad de pre-osteoclastos fusionados es determinada por la población heterogenia en términos de ausencia y presencia de DC-STAMP en la membrana plasmática de pre-osteoclastos[42]. Del mismo modo se ha observado un patrón de complementariedad en la localización de syncytin-1 en osteoclastos ya que syncytin-1 fue

encontrada concentrada en áreas de fusión de membranas en pre-osteoclastos[43], sugiriendo que esta heterogeneidad está presente en poblaciones de pre-osteoclastos. Al evaluar esta heterogeneidad en un modelo experimental que asocio el número de núcleos con la presencia de marcadores de fusión osteoclástica se determinó que la mayoría de marcadores de fusión son detectados en pre-osteoclastos u osteoclastos con dos núcleos (inmaduros), determinando que la fusión no es dependiente de una única molécula y por consiguiente es dependiente a una heterogeneidad de marcadores de fusión[44].

5.2.1 SYNCYTIN-1

Pertenece a la familia de proteínas de fusión de virus con envoltura clase I/tipo I, este grupo de proteínas no es únicamente responsable de la unión del virus al hospedero, sino también por forzar las membranas virales y del hospedero por sobre posición.[45] La unión a su receptor ASCT2 origina cambios conformacionales en syncytyn-1 que hala las bicapas lipídicas uniéndolas y causando fusión celular, al evaluar syncytin-1 en la fusión osteoclástica se determinó que estaba presente en su mayoría en la membrana de osteoclastos con 3 núcleos, por medio de inmunoflorecencia se observó una mayor intensidad en la fluorescencia en zonas de pre-fusión (acercamiento de dos bicapas lipídicas de diferentes células), utilizando un péptido inhibitorio de syncytyn-1 al inicio de la diferenciación hacia osteoclasto se observó una disminución en la multinucleación evaluada por la presencia de células multinucleadas TRAP+.[43]

5.2.2. MRF/SIRPα-CD47

La primera proteína identificada por anticuerpos que bloqueaban la fusión de macrófagos in vitro fue llamada receptor de fusión de macrófago (macrophage fusion receptor, MRF) ahora llamada SIRPα (proteína regulatoria señal α) ya que su estructura es parecida a CD4, el receptor celular de la infección por VIH. Como CD4 MRF/SIRPα es una proteína plasmática perteneciente a la súper familia de las inmunoglobulinas (IgSF) que contiene 3 loops extracelulares, subsecuentemente MRF/SIRPα fue mostrado que se une a CD47 también perteneciente a IgSF, el dominio recombinante extracelular de CD47 y MFR/SIRPα fue reportado que bloquea al fusión en cultivos celulares[46].

Mientras la expresión de CD47 es ubicua, la expresión de MFR es restringida a células mieloides y neuronas, en cuanto a la expresión MFR/SIRPα es inducida en el inicio de la fusión en macrófagos mientras que la de CD47 se mantiene constante sugiriendo la regulación de la fusión, CD47 contiene un dominio variable IgV seguido por 5 segmentos trans-menbranales que terminan en un tallo citoplasmático, MFR/SIRPα contiene un dominio amino terminal extracelular Igv y dos dominios adyacentes IgC1 (dominio contante), las formas de bajo peso molecular de MFR/SIRPα (MRFs) carecen de dominio C1 y únicamente contienen el dominio V, el loop IgV de CD47 se une al dominio IgV de MFR/SIRPα o MFRs, esta interacción es bloqueada por anticuerpos monoclonales MFR/SIRPα [47], durante la fusión CD47 se une primero a la forma larga de MFR/SIRPα, para asegurar el reconocimiento y unión de macrófagos, luego cambia a la forma corta de MFR para traer las membranas opuestas y acercarlas, tras la unión de CD47 a la forma corta MFR/SIRPα y una posible flexión del dominio IgV CD47-MRFs, la distancia entre las membranas plasmáticas de las células adyacentes se podría reducir hasta 5-10nm, lo que podría aumentar la probabilidad de fusión espontanea[48], se considera que la interacción MRF/SIRPα-CD47 está involucrada en el reconocimiento célula-célula antes de la fusión en lugar del propio proceso de fusión[49].

5.2.3 DC-STAMP

DC-STAMP (proteína transmebranal especifica de células dendríticas "dendritic cell-specific transmembrane protein") fue identificada de una librería cDNA de monocitos humanos como un receptor de siete pasos transmembrenales, sin homología con cualquier otro receptor. DC-STAMP es expresado tanto en células dendríticas maduras e inmaduras, sus niveles de mRNA aumentan con el ligando CD40, es sobre expresado en células gigantes de tumores junto con el receptor activador de NF-KB (RANKL)[47 49].

En ensayos iniciales de DC-STAMP se observó que en cortes histológicos de tibia de ratones knockout para DC-STAMP fueron TRAP+, sin embargo, al cuantificar la multinucleación se determinó que fue nula, el mismo resultado fue obtenido cuando se llevó a diferenciación osteoclástica cultivos de medula ósea derivados de estos ratones con M-CSF (factor estimulador de colonias de macrófago), RANKL y el interferente DC-STAMP, al evaluar los niveles de mensajero de c-Fos, *NFATc1*, catepsina K no se observó

diferencias entre el silvestre y el mutante, sugiriendo que la osteoclastogénesis se puede llevar a cabo sin fusión celular.[50]

En cuanto a los factores de transcripción que regulan la expresión de DC-STAMP en osteoclastos se evaluaron por un modelo experimental que se basó en el bloqueo farmacológico de NFATc1 con FK506 (inhibidor de la localización nuclear de NFATc1) o por knockout de c-Fos en cultivos celulares llevados a diferenciación osteoclástica con M-CSF y RANKL en células monoculares de ratones silvestres o c-Fos(-/-), se determinó que la expresión de DC-STAMP disminuye al bloquear estos factores de transcripción, para confirmar este resultado se llevó acabo un ChIP (inmunoprecipitación de cromatina) mostrando que los dos factores de transcripción fueron reclutados por la región promotora DC-STAMP[51].

5.2.4 OC-STAMP

Por medio de un microarreglo en células RAW 264.7 tratadas en medio de diferenciación convencional M-CSF y RANKL se encontró un gen sobreexpresado el cual se denominó OC-STAMP proteína transmembranal estimuladora de osteoclasto (Osteoclast Stimulatory Transmembrane Protein), la cual al ser silenciada por un siRNA disminuyo el número de células multinucleadas TRAP+, al analizar la secuencia de sus aminoácidos se determinó que no tenía similitud con otra proteína excepto para DC-STAMP; la organización en relación con su estructura es similar (proteína transmebranal multipaso), y contiene una región con alta homología a DC-STAMP (193 aminoácidos de 254–446 de OC-STAMP en la posición 242–421 DC-STAMP), de hecho su secuencia en gran porcentaje es diferente[52].

Al evaluar la expresión de OC-STAMP en diferentes tejidos musculo, placenta, hígado, cerebro, piel, hueso, osteoclasto y células gigantes multinucleadas de ratón se observa que la expresión de OC-STAMP solo es apreciable y sobreexpresado en osteoclastos y células gigantes multinucleadas[53], un resultado similar al obtenido al evaluar DC-STAMP en estos mismos tejidos[50 51], este resultado y el obtenido preliminarmente del declive de la fusión al silenciar OC-STAMP[52] sugiere que esta proteína es clave en la fusión de osteoclastos, para

confirmar este resultado los investigadores utilizaron ratones knockout para OC-STAMP observando un aumento respecto a los ratones de tipo silvestre en la densidad ósea, al evaluar la expresión de marcadores característicos en osteoclastos derivados de medula ósea en estos ratones se observó que no se encontró diferencias frente a osteoclastos obtenidos a partir de medula ósea de ratones tipo silvestre, indicando que OC-STAMP solo intervine en la fusión osteoclástica mas no en la maduración[53].

5.2.5 DC-STAMP y OC-STAMP

La literatura reportada hasta el momento muestra que tanto DC-STAMP como OC-STAMP son calves para la fusión tanto de osteoclastos como de células gigantes de cuerpo extraño (FBGC)[49 51 53], hasta el momento no se sabe con exactitud el ligando de las dos proteínas, al realizar co-cultivo de células tipo silvestre con células deficientes DC-STAMP se logra la fusión de las células deficientes DC-STAMP[50], lo mismo ocurrió con células deficientes OC-STAMP, sugiriendo que la fusión es inducida a través de una interacción heterofílica entre un iniciador o fundador (founder) y algún componente celular de la fusión incluso en poblaciones homogéneas de macrófagos, al realizar co-cultivo de pre-osteoclastos tanto DC-SATMP deficientes como OC-STAMP deficientes la fusión no se lleva acabo tanto en osteoclasto o FBGC, sugiriendo que estos dos componentes cooperan entre sí para modular la fusión celular[53].

5.3 QUIMIOTAXIS y FUSIÓN

Las quimioquinas son una gran familia de citoquinas quimiotácticas que proveen un señal clave para el tráfico y homeóstasis de subpoblaciones específicas de leucocitos y otros tipos de célula en procesos como fisiológicos y patológicos, ellos están divididos en cuatro grupos de acuerdo a su estructura y características de sus ligandos, de los cuales tienen 2 subfamilias; mayores (CC y CXC) y menores (CX3 y C), de los ligandos (CC) se han reportado; proteína inflamatoria de macrófago (MIP-1), proteína quimio atrayente de monocito (MCP-1) y reguladora en activación, expresada y secretada en células-T (RANTES)[54]. En pre osteoclastos llevados a diferenciación osteoclástica el receptor más expresado es CCR1, los ligandos que más producen motilidad en osteoclastos son RANTES y MIP-1[55].

RANTES y MCP-1 son expresados en pre-osteoclastos (células de medula ósea) tratados con M-CSF y RANKL, el solo tratamiento de RANTES o MCP-1 induce fusión; determinada por la presencia de células multinucleadas TRAP+, a pesar de ello estas células no tienen capacidad resortiva, sugiriendo un papel extra de MCP-1 y RANTES en la fusión celular[56], la carencia de resorción ósea es correlacionado con la deficiencia en la expresión de MMP-9 y catepsina K, la deficiencia en al resorción es rescatada por la adición de RANKL[57], MCP-1 ha sido implicado en la fusión célula-célula en la osteoclastogénesis, de hecho en células derivadas de medula ósea de ratón MCP-1 deficiente se observa que pese al tratamiento con RANKL la fusión celular es muy baja, el tratamiento con MCP-1 recombinante rescata la fusión celular. El efecto observado de inducción de la fusión independiente de RANKL[56 57] no ocurre en pre osteoclastos DC-STAMP deficientes[58] por lo cual se piensa hipotéticamente que MCP-1 sea ligando de DC-STAMP, en el momento esta hipótesis no ha sido comprobada.

5.4 OBTENCIÓN DE CÉLULAS SIMILARES A OSTEOCLASTOS POR PEG

PEG es utilizado como modelo experimental para el estudio de la fusión de vesículas, el utilizado para este propósito es de un peso molecular entre 1000 a 10000, es un polímero lineal de óxido etileno con un grupo hidróxido terminal, a diferencia de muchos polímeros PEG es soluble en agua a temperatura ambiente en todas las proporciones sobre un rango amplio de moléculas, su inusual solubilidad en agua resulta de la estructura zigzagueante de su esqueleto que está compuesto por polímeros de 9 o más unidades, esto quiere decir que maximiza los puentes de hidrogeno mientras minimiza el número de grupo hidrofóbicos expuestos, su viscosidad ha sido atribuida al número de moléculas de agua que se asocian con los monómeros óxido de etileno, esta afinidad por el agua es responsable de la elevación de la presión osmótica de PEG en las soluciones[59].

Existen dos pasos críticos para que PEG induzca la fusión de membranas: agregación de los precursores de la fusión seguida por la desestabilización de las bicapas y subsecuente fusión. Se ha propuesto que la agregación de células tratadas con PEG se puede producir por dos mecanismos: la interacción entre el PEG absorbido en la superficie celular lleve a

las células a agruparse, o que PEG sea eliminado de las superficies celulares y las células sean conducidas a unirse por la presión osmótica resultante de la disminución de polímero esta última teoría es la más aceptada[59].

El PEG contribuye a cerrar los espacios o "gaps" de la interbicapa lipídica. Entonces, el PEG remueve las moléculas de agua entre las bicapas adyacentes, debido a la alta afinidad que tiene este polímero por el agua. Además, el solo PEG no puede disparar la fusión, si los fosfolípidos de membrana se encuentran dañados o flácidos[59]. Entonces, la fusión ocurre solo cuando la energía de superficie de las bicapas lipidicas es modificada por la adición de componentes de bajo estrés[60].

Es interesante ver que mientras el umbral de la concentración de PEG para la fusión es dependientemente de la composición y estructura de las membranas a fusionar, mientras que el umbral para la agregación es ampliamente independiente de ellas[59]. Esto indica que se necesita una fuerza diferente para la fusión y otra para la agregación. Por lo cual, las fuerzas empleadas son rangos cortos críticamente dependientes de la desestabilización de las bicapas por deshidratación, mientras que la deshidratación depende de la adsorción del PEG[60].

Las células se agregan cuando se suspenden en la solución de PEG concentrado [59]. La extrema deshidratación y alta presión osmótica en las zonas de contacto forza a las proteínas integrales de membrana a alejar del área donde las bicapas lipidicas se acercan, oponiéndose unas con otras, la segregación de las proteínas de membrana en la zona de contacto puede ser visualizada por una fractura libre, la cual puede ser observada por microscopía electrónica. Entonces, la fusión célula a célula es usualmente iniciada en las zonas de contacto y la fusión del sitio se expande durante la subsecuente pasos de lavado de PEG[61]. Por lo cual, la dilución de PEG después del tratamiento en las células es un paso crucial sin el cual la fusión que se produce es baja.

Se han propuesto tres pasos por los cuales PEG media la fusión de vesículas fosfolipidicas, el primer paso involucra la formación de un intermediario reversible (I_1), consistente de una mezcla dinámica de dos formas inestables; un tallo de hemi-fusión y un pequeño poro transitorio, este intermediario inestable es reversible a vesículas no fusionadas si PEG es

diluido[62], si el contacto de las bicapas es mantenido el intermediario I_1 madura en un segundo paso a un intermediario semi-estable I_2, descrito como una hemi- fusión o un "septum"[63], la existencia de un segundo intermediario fue establecida claramente por demostrar que la disolución de PEG en tiempos incrementales reduce el retorno a la forma original e incrementa los productos de fusión observados[62], el tercer paso involucra la formación un poro de fusión (FP), se especula que el FP es el resultado de un estallido espontaneo del septum una vez este crece a un punto donde es desestabilizado por su gran tamaño, el poro transitorio es también observado en la fusión viral mediada por proteínas[64].

Existen paralelos entre la fusión con PEG y la fusión observada en el virus de la influenza con la membrana endosomal; el primer paso del proceso de fusión implica el movimiento transitorio de protones entre las vesículas y cambios transitorios de capacitancia en células que expresan hemaglutinina (HA) del virus de la influenza y gránulos secretores (SG). Al mismo tiempo, las hojas de membrana en contacto intercambian lípidos durante la fusión mediada por PEG en una escala de tiempo y con una energía de activación comparable a la observada en la fusión mediada por HA. Hay un retraso de duración comparable a la observada para la fusión mediada por HA y SG entre el poro transitorio y la formación de poro de fusión, Finalmente, la velocidad y la energía de activación de la formación de poros de fusión en la fusión mediada por PEG es comparable a la observada en la fusión mediada por HA[6560], Este paralelismo significa que podemos usar el proceso de fusión mediado por PEG para fusionar precursores osteoclasticos ya que utilizando PEG se puede lograr un acercamiento entre bicapas en ausencia de proteínas.

Teniendo en cuenta este paralelismo y sabiendo que el osteoclasto es en parte el resultado de la fusión del linaje monocito/macrófago[1] el profesor Carlos Guerrero sugirió que induciendo la fusión de monocitos por PEG se podría lograr células similares a osteoclastos, esta hipótesis fue evaluada y comprobada al obtener células multinucleadas TRAP+ con capacidad resortiva ósea al fusionar células U937 con PEG[18].

5.5 FUERZAS EN OSTEOCLASTO

Los movimientos dentales ortodónticos son modelos de estudio que ayudan a elucidar el mecanismo por el cual las cargas mecánicas inducen la remodelación ósea, estos modelos

experimentales se han realizado principalmente en ratas y ratones, el movimiento ortodóntico es alcanzado por la resorción alveolar en la zona de compresión y la formación ósea en la zona de tensión.[66]

Las cargas mecánicas afectan el movimiento dental gracias a respuestas biológicas de las células del ligamento periodontal, muchas citoquinas y hormonas están involucradas en el proceso, se ha reportado que el movimiento ortodónticos aumenta los niveles de TNF-α en surcos gingivales humanos,[67] mostrado que TNF-α es expresado en el tejido periodontal de ratas bajo condiciones patológicas que resultan en un excesivo movimiento dental. En modelos experimentales murinos deficientes de TNFR1 o TNRF2, en donde se aplicaron fuerzas ortodónticas se observó que hubo menos movimiento dental comparado con los grupos controles, en otro estudio que utilizo el mismo modelo experimental se determinó la disminución de células multinucleadas TRAP+ en ratones deficientes para TNRF1, [68] sugiriendo que TNF-α está relacionado con el movimiento dental.

Las citoquinas encontradas en el área gingival durante un tratamiento de ortodoncia aporta información sobre el metabolismo local, reflejando el estatus de salud periodontal y remodelado óseo. Muchas investigaciones han encontrado expresión de citoquinas en zonas gingivales durante el movimiento dental, sugiriendo que estas controlan la diferenciación a osteoclasto u osteoblasto según la fuerza aplicada (compresión o tensión respectivamente), como lo son las interleuquinas 6 y 17 que inducen la resorción ósea por osteoclastos o interleuquinas 12, 18 que inhiben la formación de osteoclastos por medio de TNF-α.[66]

La resorción ósea que ocurre durante el movimiento ortodóntico es un proceso que involucra una respuesta inflamatoria aguda en los tejidos periodontales. La aplicación de estímulos mecánicos en forma de fuerzas ortodónticas causa una reacción inflamatoria dentro del tejido periodontal, que en cambio puede activar procesos biológicos relacionados con el remodelado óseo.[69]

Las prostaglandinas (PG-s) son agentes producidos por las células de los mamíferos incluyendo osteoclastos, son derivados el ácido araquidónico, sintetizados inmediatamente en respuesta a la injuria tisular,[70] las PG-s existen en dos isoformas cicloxigenasa 1 y 2 (COX-1, COX-2), son producidos en altas concentraciones durante procesos inflamatorios,

la aplicación de fuerzas ortodónticas implica concentración de estrés en la matriz extra celular y la deformación de osteocitos del hueso alveolar, esta deformación a su vez abre los hemi-canales en el osteocito tensado y permite la liberación de prostanglandinas que son responsables de inducir del movimiento ortodóntico por medio de la resorción. [71]

Se ha observado que COX está asociado con periodontitis y que las PG-s median la inflamación y resorción alveolar, muchos estudios han confirmado que los niveles de PGE2 en tejido periodontal o fluido crevicular están altamente relacionados con destrucción periodontal, COX2 tiene un importante rol en la inflamación alveolar y pérdida ósea durante la progresión de la periodontitis.[72] La expresión y producción de PGE2 es promovida por la estimulación mecánica del ligamento periodontal, las prostaglandinas de la serie E también juegan un rol importante en la patogénesis de la periodontitis crónica por regular la producción de osteoclastos.[73] Como consecuencia de la aplicación de fuerzas ortodóncicas el PDL y las células del hueso alveolar se distorsionan, ellas pueden activar vías de señalización incluyendo la vía PGE2, que son capaces de iniciar cambios estructurales y funcionales en la membrana celular, cito esqueleto y matriz extracelular, los cambios en la estructura del citoesqueleto permiten la creación de nuevas células y la formación de matriz ósea.[74] Es por ello que PGE2 es un bio-marcador para la resorción ósea que es utilizado para monitorear los movimientos ortodónticos.

El principal factor desencadenante responsable del movimiento ortodóntico es la tensión experimentada por las células PDL y la matriz extracelular, esta tensión tiene como resultado la alteración en la expresión génica dentro de las células y la matriz extracelular, resultando en la síntesis de varias citoquinas que regulan el remodelamiento óseo en respuesta a cargas mecánicas. Las fuerzas ortodónticas causas vasodilatación capilar dentro de los vasos sanguíneos del ligamento periodontal resultando en la migración de células inflamatorias y producción de citoquinas, induciendo el proceso de remodelado óseo. [75]

La recidiva en ortodoncia es definida como el retorno hacia la condición de pretratamiento, estudios experimentales han demostrado que si el movimiento dental no es seguido por el remodelado de los tejidos de soporte el diente tendera a retornar a su posición original, el ligamento periodontal tiene la habilidad de invertir sus fibras en el hueso alveolar y

cemento durante la aposición de nuevo cemento y hueso actuando como una zona de anclaje para el diente.[21]

Experimentalmente al evaluar el efecto de las fuerzas compresivas en fibroblastos de ligamento periodontal y gingivales (FG) cultivados con células de medula ósea murinas (precursoras de osteoclastos), se observa una disminución en la osteoclastogénesis cuando se realizó el cocultivo y se sometía a fuerzas centrifugas (50 g/cm2 por 60 min), la inhibición osteoclastogénica no fue observada al realizar el cocultivo en la presencia de anti-osteoprotegerina (OPG), al evaluar los niveles de OPG se determinó que en ese cocultivo los fibroblastos periodontales y gingivales expresaron a la alta OPG, sugiriendo que fuerzas centrifugas inhiben la osteoclastogénesis,[76] sin embargo, estos tejidos no fueron evaluados por separado (pre-osteoclastos, GP y FLP) para determinar el efecto de las fuerzas compresivas en estos tejidos.

5.6 ROS

Las especies reactivas de oxigeno (ROS) son producidas primariamente por la mitocondria en células como un sub producto del metabolismo normal durante la conversión del oxígeno molecular (O2) a agua (H2O). Estos subproductos incluyen el radical súper oxido (O2-), peróxido de hidrogeno (H2O2) y el radical hidróxido (OH), la encima súper oxido dismutasa (SOD) convierte estos en H2O y O2, entre otras moléculas antioxidantes se pueden enlistar el glutatión y la theoredoxina.[77]

Las células han desarrollado muchas defensas antioxidantes, estas incluyen; vitamina C, E, y enzimas como: catalasa, SOD, y glutation peroxidasa. El estrés oxidativo es generado cuando hay un imbalance entre oxidantes y antioxidantes, este estrés puede dañar o modificar macromoléculas en las células incluyendo el ADN, proteínas y lípidos[78], los ROS en bajas concentraciones pueden también servir como mediadores para una variedad de señales de traducción y expresión génica[77].

5.7 NAC

La N-acetilcisteina (NAC) es un tiol, un agente mucolítico y un precursor de L-cisteina y glutatión reducido, en la célula es una fuente de grupos sulfhidrilo (-SH) que elimina los

radicales libres a medida que interactúa con ROS como (-OH) y H2O2. NAC se utiliza en diferentes patologías como: enfermedades cardiovasculares, toxicidad hepática por acetaminofén y toxicidad por metales.[77]

Químicamente es derivado de una cisteína con un grupo acetil unido a su átomo de nitrógeno y similarmente a muchos tiols (RSH), puede ser oxidado por una larga variedad de radicales y también sirve como un nucleófilo (donador de electrones), la reactividad de aniones tiolato (RS-) hacia dióxido de nitrógeno, ion trióxido de carbono, azida (*N) o superóxido es superior al de (RSH) con excepción al radical hidroxilo que abstrae eficientemente el átomo de H de RSH. RS- tiene reactividad hacia oxidantes no radicales como H2O2, peroxinitrato e hipoclorito.[79]

NAC es precursor de L-cisteina, farmacológicamente está disponible en forma intravenosa, via oral o por inhalador, tiene relativamente baja toxicidad y está asociado con efectos secundarios como nauseas, vomito, rinorrea, prurito y taquicardia. La vida media de NAC después de administrarlo por vía intravenosa es de 5.6 horas donde el 30% de la droga es excretada por vía renal, se especula que su baja biodisponibilidad (5%) está asociada con su N-desacetilación en la mucosa intestinal y el metabolismo del primer paso por el hígado, el plasma es un medio bien pro oxidante y de hecho reacciones de intercambio redox entre NAC, cisteína, cistina (forma oxidada de cisteína, mayor forma presente en plasma[80]) y proteínas cisteína en el plasma produce NAC-cisteína, NAC-NAC y cisteína esta última capas de cruzar la membrana celular y servir como sustrato para la elaboración de glutatión (GSH).[81]

Se ha mostrado que NAC actúa como fuente intracelular de cisteína así mismo NAC reduce la cantidad plasmática de cistina a cisteína, así permite que la cisteína entre a la célula, en cuanto al glutatión este es sintetizado a partir de sus aminoácidos constituyentes: glutamato, cisteína y glicina, por la acción de la L-glutamato-cisteína ligasa (EC6.3.2.2) y glutatión sintasa (EC 6.3.2.3).[80]

5. MÉTODOS

6.1 Láminas de hueso

Las láminas de hueso se elaboraron a partir de hueso cortical de tibia y fémur de bovinos; inicialmente, los huesos se cortaron transversalmente con una sierra eléctrica y se lijaran manualmente hasta obtener láminas de hueso con superficies homogéneas con un área de $1cm^2$ y un grosor de 0.5 mm. Antes de utilizar las láminas de hueso para realizar los cultivos celulares y el tratamiento con PEG, estas láminas se sumergieron en una solución de SDS al 10% por 8 horas bajo agitación continua, se lavaron doce veces con agua destilada hasta eliminar totalmente el detergente, se esterilizaron con etanol al 70% por 60 minutos, se lavaron dos veces con medio DMEM suplementado con 10% SFB, finalmente se dejaran bajo luz U.V por 1 hora.[18,19]

6.2 Fusión con PEG

Para la fusión celular, las células U937 fueron desprendidas, lavandas tres veces con PBS-EDTA 0.02% sal disodico, centrifugadas y re suspendidas en DMEM para contarlas (aproximadamente $1x10^6$/ml). Se centrifugaron y se eliminó el sobrenadante, luego se colocó el tubo sobre gasa estéril para eliminar todo residuo de DMEM y evitar diluir el polietilenglicol (PEG). Se agregó 50 µl de PEG de peso molecular 3000, previamente calentado a 37º C, se agito suavemente, mediante golpes con el dedo en la base del tubo, para homogenizar el botón celular en el PEG y se llevó a 37º C durante 5 minutos. A partir de ese momento se adiciono 40 µl de DMEM cada 60 segundos por 5 minutos, posteriormente 80 µl de DMEM cada minuto durante 5 minutos y 160 µl de DMEM cada minuto durante 5 minutos. Posteriormente las células se centrifugaron y se lavaron dos veces con DMEM para retirar el PEG.[18,19]

6.3 Células U937 fuerzas compresivas

Las células U937 fueron desprendidas, lavadas tres veces con PBS-EDTA 0.02% sal disodico, centrifugadas y resuspendidas en DMEM para contarlas (aproximadamente $1x10^6$/ml). Se centrifugaron y elimino el sobrenadante, luego se colocó el tubo sobre gasa estéril para eliminar todo residuo de DMEM, las células no fusionadas que fueron sometidas a fuerza centrífuga se sembraron en las láminas de hueso (17000 aproximadamente) se colocaron en una caja de 24 pozos, se pusieron en un motor rotatorio horizontal (Rototorque – ColeParmer®) a velocidad No. 10 (60 rmp) a velocidad constante, las células serán fijadas en los días 1, 2, 4. Para determinar la fuerza de compresión a la cual se sometieron las células se utilizará la formula P = (m*r*rpm2*π2)/(A*9.8*900) donde P=kg de presión por cm2 de células, m= masa en gramos del medio, r = radio, rpm revoluciones por minuto, área de contacto entre el medio y las células en cm2,[76] [15] al calcular la fuerza ejercida sobre las células se estableció que la fuerza compresiva fue de 0.92g/cm2.[76] [15]

6.4 Siembra y Tratamiento con NAC

30µl (17000 células) de células U937 tratadas o no con PEG en medio de cultivo suplementado con SFB al 10% se sembraron en láminas de hueso colocadas en cajas de 24 pozos por 2 horas para que se adhirieran a la lámina de hueso en una cámara al 5% CO2, 95% de humedad a 37°C, después de este tiempo los pozos fueron llevados a un volumen final de 400µl a una concentración de 30mM de NAC, como grupo control se tubo los pozos en los cuales no se adiciono NAC o las células que solo se dejaron en medio de cultivo suplementado al 10% SFB, libres de fuerzas compresivas o de tratamiento con NAC.

6.5 Evaluación niveles ROS

Para determinar el nivel de ROS las láminas en donde previamente se sembraron las células U937 serán tratadas con 50 ul de DHE 50 uM con hoechst (1:1000) en medio de cultivo

por 10 minutos después de este tiempo se fijará con paraformaldehído al 4% por 10 minutos luego las láminas serán lavadas 4 veces con PBS, La lámina ósea se colocará sobre una laminilla porta objetos, sobre las láminas de hueso se colocará una laminilla cubre objetos, se pondrá aceite de inmersión y se observará la Inmunofluorescencia en un microscopio Vanguard® con un objetivo 100x a las 12 horas, 1,2 y 4 días de cultivo. Se tomaron 7 fotos representativas por cada lamina de hueso y los niveles ROS fueron determinados en cada fotografía cuantificando la intensidad de fluorescencia con el programa (ImageJ 1.3, Wayne Rasband National Institutes of Health, disponible gratis en http://rsb.info.nih.gov/ij/), los niveles se expresaron en intensidad media de fluorescencia. Los ensayos fueron hechos por duplicado y se repitieron dos veces.

6.6 Evaluación de la expresión de Fosfatasa ácida resistente a Tartrato (TRAP).

Se determinó si las células multinucleadas expresan fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) característica de los osteoclastos. Las células multinucleadas fusionadas se fijaron con una mezcla de etanol/acetona (50:50 v/v), pre-enfriada a 0º C, durante 40 minutos a 4 ºC. Posteriormente las células se colocaron en pararosanilina hexazotizada con tartrato (2,8 gr. / mL) con nitrito de sodio en buffer veronal utilizando naftol fosfato ASB1 (Sigma) como sustrato y se adiciono tartrato de sodio (28 mg/10 ml) se ajustó el pH a 5.2. Se dejaron a 37 ºC durante 3 h, se lavaron en PBS, y el número de células fusionadas (más de tres núcleos) TRAP positivos fueron identificadas por el color rojizo, estas se contaron en el microscopio de luz con un objetivo 40 X. Para su evaluación se contaron las células totales TRAP+ (rojas ladrillo) y se dividieron respecto al área del hueso (determinada con un conteo de campos en el objetivo 40X multiplicado por 0,16 mm^2) y de esta manera se determinó las células TRAP+ por área de hueso. Posteriormente se realizó un registro de fotografías con cámara digital (Cannon S70).[18,19]

6.7 Evaluación De La Actividad Resortiva.

Las células una vez tratadas como se describió anteriormente, se sembraron sobre láminas de hueso cortical bovino estériles de 0.5 mm de espesor. Como control experimental se

evaluó la actividad resortiva de células U937 en medio de cultivo sembradas en láminas de hueso. Para retirar las células de la lámina de hueso, se adiciono buffer de lisis RIPA durante 120 minutos. Para eliminar los residuos celulares o células no lisadas del hueso se froto cuidadosamente con un cepillo dental de cerdas suaves. El hueso se tiño con hematoxilina durante 5 minutos, se dejaron secar y luego se coloreo con azul de Commassie durante 30 minutos (en caso de haber sobre coloración del hueso, éste se decolorará con una mezcla de metanol – ácido acético – agua, 50:10:30, hasta encontrar el contraste necesario visualizado en microscopio óptico). Los cortes de hueso se observaron al microscopio óptico y se tomaron fotografías con cámara digital (Cannon S70). El extendido de la resorción de cada fotografía se evaluó mediante un programa computacional de análisis de imágenes (ImageJ 1.3, Wayne Rasband National Institutes of Health, disponible gratis en http://rsb.info.nih.gov/ij/) y se expresó en porcentaje total de área resorbida.[19]

Los ensayos fueron hechos por duplicado y se repitieron dos veces.

Porcentaje de resorción = Área total resorbida/Área total del hueso X 100.

6.8 ANÁLISIS DE MARCADORES OSTEOCLÁSTICOS

6.8.1 Evaluación de fusión

Para evaluar los eventos de fusión se utilizaron los reactivos DiO y DiD, estas carboxiaminas lipofilicas tienen una baja fluorescencia en agua, de hecho al estar unidas a membrana plasmática aumentan su fluorescencia, una vez es aplicado a las células el colorante se difunde dentro de la membrana plasmática resultando en la tinción completa de la célula, por ende al tratar dos suspensiones de células con DiD y DiO, posteriormente someterlas a cultivo se pudo determinar eventos de fusión por sobrelapamiento de las células fluorescentes evaluadas en un microscopio de fluorescencia.

Las células U936 se resuspendieron en dos tubos Falcon de 10 ml en una densidad de 1x10e6/ml en 1 ml de medio DMEN, se adiciono 5µl de 240 µg/ml de DiO o 5 µl de 3.5 mg/ml de DiD, mezclando generosamente por pipeteo, se incubo los reactivos DiO o DiD por 20 minutos a 37°C, se centrifugo la suspensión a 1500 rpm por 5 minutos, se descartó el

sobre nadante y se resuspendio generosamente en medio a 37°C, se repitió el proceso de suspensión, descarte y centrifugado por dos veces, después se resuspendieron nuevamente en 1 ml de medio DMEN y se llevó el contenido de un tubo al otro, se centrifugo esta suspensión a 1500 rpm por 5 minutos.[82] [83]

Después de este procedimiento se realizó la siembra de las células U937 ya incubadas con DiD y DiO en los grupos experimentales descritos anteriormente (fusión con PEG y fuerzas compresivas), en los días 1, 2 y 4 post siembra las láminas fueron fijadas con paraformaldehído al 4 % (P/V) por 10 minutos, se observó la inmunofluorescencia en un microscopio Vanguard® con una fuente de excitación de 484nm y 644nm (DiO y DiD respectivamente) con un objetivo 100x, se tomaron 7 fotos representativas por cada lamina de hueso con una cámara digital (Cannon S70).
La fusión se determinará por el sobrelapamiento ("overlap") de las imágenes realizadas con el programa Image J y se expresó en términos de % de sobrelapamiento. Los ensayos serán hechos por duplicado y se repetieron dos veces.

6.8.2 Inmunofluorescencia Indirecta

Para determinar en las células U937 tratadas con PEG, sometidas a fuerzas compresivas o en medio de cultivo tratados o no con 30mM de NAC, la expresión de los marcadores osteoclastogénicos**:** anhidrasa carbónica II (CA II), la subunidad C1 de la ATPasa Vacuolar H^+ VI (ATPC1), catepsina K (CK), receptor de calcitonina (RC), ADAM 12, proteína transmebranal especifica de células dendríticas DC-STAMP, metaloproteinasa 9 (MMP 9) la subunidad β_3 de la integrina $\alpha_v\beta_3$ (IB3), NFKβ-p se realizaro una inmunofluorescencia indirecta.[19]

En este caso, las células tratadas con PEG, fuerzas compresivas o dejadas en medio de cultivo se sembraron en matriz ósea durante 2 ó 4 días tratados o no con 30mM NAC por los tiempos indicados. Al cabo de estos tiempos, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y se permeabilizarán con una solución de 0.1% de triton x100, 80 mM Buffer HEPES, 50 mM de NH_4Cl, por 30 minutos a 4 °C. Luego, se incubaron a 37 ° C por 40 minutos, los anticuerpos señalados en la Tabla 1. Se lavaron cinco veces con PBS que contiene 0.05% de azida y 50 mM de NH_4Cl. Se incubaron a 4 °C durante 60 minutos

con los anticuerpos secundarios policlonales señalados en la Tabla 1. El grupo control (células U937 en medio de cultivo) se incubo con los mismos anticuerpos. Estos ensayos se realizaron por duplicado.[19]

La lámina ósea se colocaron sobre una laminilla porta objetos, sobre las láminas de hueso se colocará una laminilla cubre objetos, se adiciono aceite de inmersión y se observó la inmunofluorescencia en un microscopio Vanguard® con un objetivo 100x. Los ensayos fueron hechos por duplicado y se repitieron dos veces.

6.8.3 Evaluación de Anillos de Actina.

Las células U937 tratadas con PEG o sometidas a fuerzas compresivas fueron fijadas al día 4 de cultivo con una solución ácido acético/etanol 50:50 a 4°C por 24 horas, luego de este tiempo las células fueron lavadas 4 veces con PBS a 4°C, tratadas con falloidina unida a un fluorocromo (Alexa 488) 1:1000 a 4°C más Hoechst 1:1000 por 24 horas. Los ensayos fueron hechos por duplicado y se repitieron dos veces.

6.9 Análisis estadístico

Los datos fueron expresados como la media ± el error promedio de la media de los experimentos independientes para cada condición experimental. La diferencia de los grupos de los tratamientos fue analizada por el método de ANOVA de doble vía. Para evaluar el grado de correlación entre las variables se realizó una prueba de correlación de Tuquey.

Tabla 1

Antígeno que reconoce	Origen	Tipo	Concentración	Fluorógeno conjugado	Casa comercial
Adam 12	Cabra	IgG	1:1000	FITC	Santa Cruz
MMP9	Cabra	IgG	1:1000	FITC	Santa Cruz
DC-STAMP	Conejo	IgG	1:1000	FITC	Santa Cruz
Catepsina K	Conejo	IgG	1:1000	FITC	Santa Cruz
RC	Conejo	IgG	1:1000	FITC	Santa Cruz
CA II	Conejo	IgG	1:1000	FITC	Santa Cruz
ATPC1	Cabra	IgG	1:1000	FITC	Santa Cruz
Vβ3	Conejo	IgG	1:1000	FITC	Santa Cruz
NFKβ-p	Cabra	IgG	1:1000	FITC	Santa Cruz

7. RESULTADOS

7.1 EVALUACIÓN NIVELES ROS

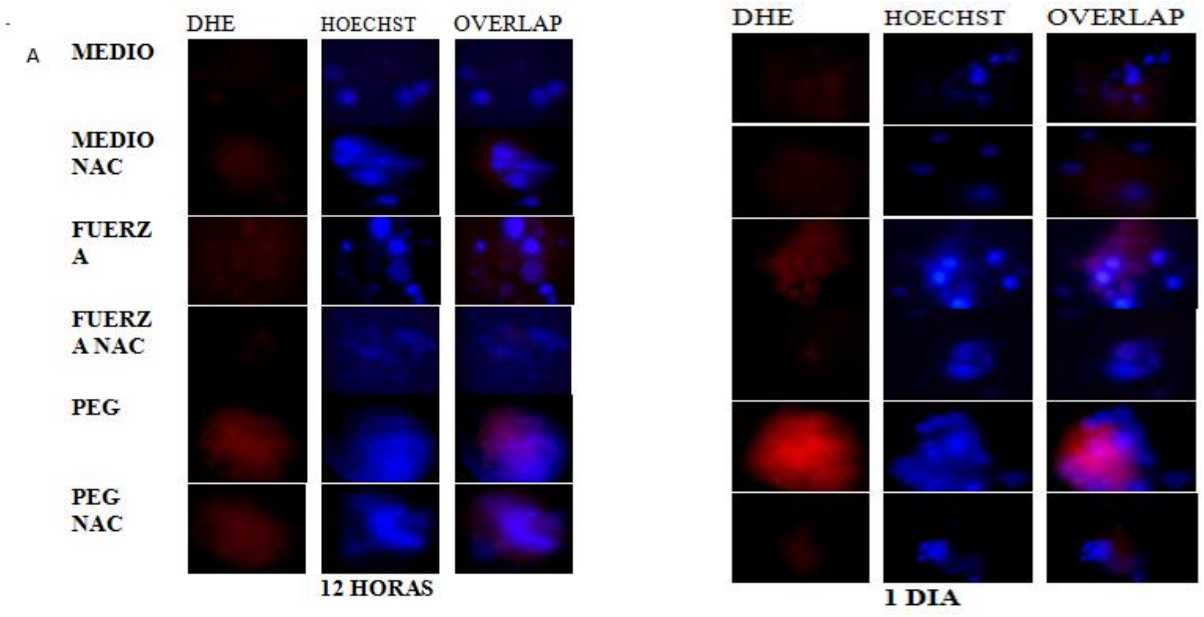
Para evaluar los niveles celulares ROS se utilizó el reactivo DHE que al ser oxidado se puede unir a al DNA de la célula tiñendo el núcleo de un tono rojo fluorescente, en células U937 sembradas sobre láminas de hueso de origen bovino y cultivadas durante 12 horas, 1 día, 2 días y 4 días sin NAC (grupo control), la intensidad de fluorescencia fue baja y en ocasiones no fue percibida, un efecto similar fue obtenido al tratar las células en medio de cultivo con 30mM NAC, este resultado se asocia con un ambiente celular no oxidativo.

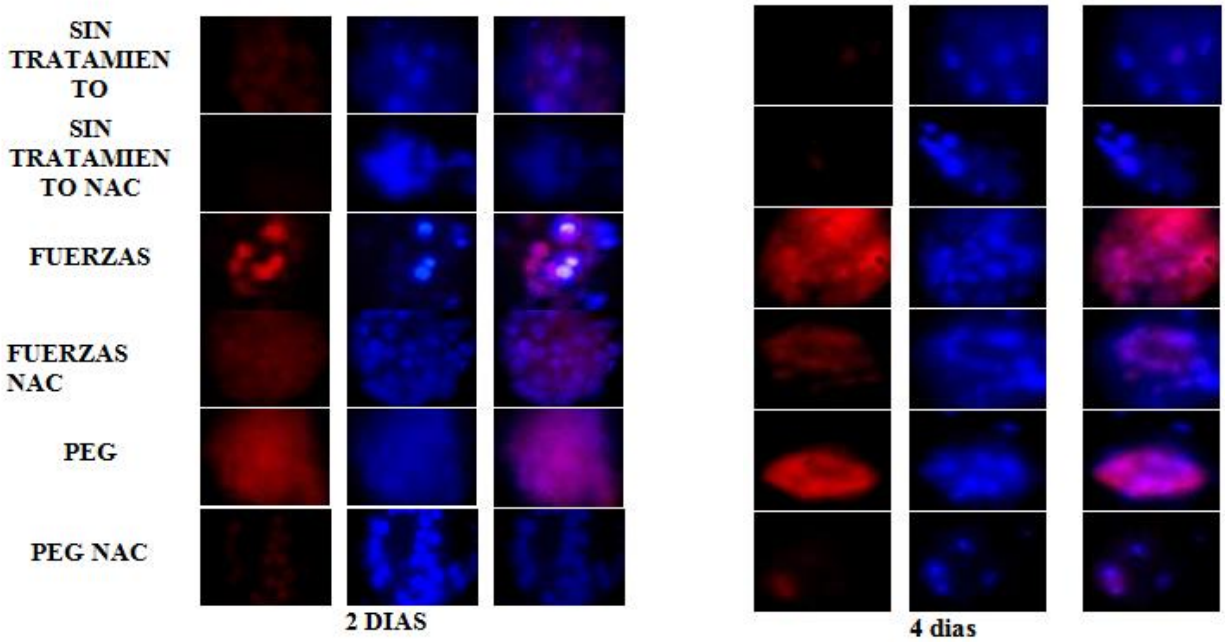
En cuanto a las células U937 fusionadas con PEG se observó un aumento en la intensidad media de fluorescencia compara con el grupo control (células cultivadas sin ningún tratamiento en medio de cultivo) desde el primer día de cultivo (figura 1B y 1E), esta intensidad disminuyo a los dos y cuatro días de cultivo, no obstante la intensidad media de fluorescencia para estos dos días de cultivo fue mayor al grupo control con diferencias altamente significativas ($P< 0.001$) figura 1E, en las células fusionadas con PEG y tratadas con 30 mM de NAC la intensidad media de fluorescencia fue menor a las células fusionadas con PEG y no tratadas con NAC, estos valores fueron similares al grupo control, lo cual evidencia que las células U947 fusionadas con PEG muestran un aumento en la concentración de ROS a partir del primer día de cultivo y que este aumento es disminuido por el tratamiento con 30mM de NAC.

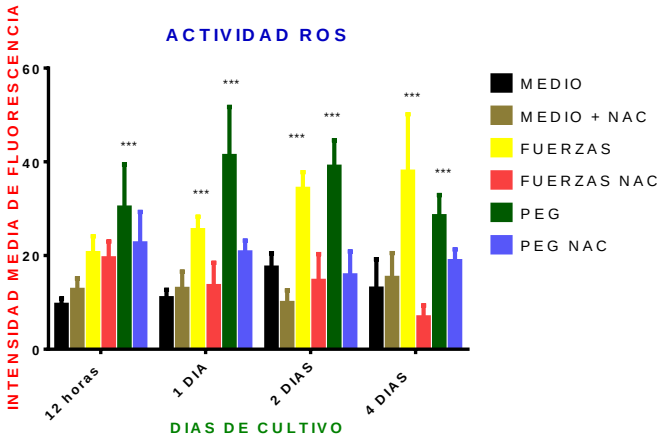
En células U937 sometidas a fuerzas compresivas se observó un aumento en la intensidad media de fluorescencia a partir del primer día de cultivo comparada con el grupo control, pero no mayor al que se observó cuando las células fueron fusionadas con PEG (figura 1 A y 1B), al segundo día de cultivo no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P>0.05$) en la intensidad media de fluorescencia entre las células fusionadas con PEG o sometidas a fuerzas centrifugas, sin embargo, este aumento observado a partir del segundo día de cultivo fue mayor al obtenido en PEG al cuarto día de cultivo figura 1D, al evaluar células U937 sometidas a fuerzas compresivas y tratadas con 30mM de NAC se observó una intensidad media de fluorescencia menor a que a las células sometidas a fuerza

centrífuga y no tratadas con NAC, estos valores fueron similares al apreciado en el grupo control, indicando que someter células U937 a fuerzas compresivas aumenta la concentración intra celular de ROS y que este efecto es suprimido por un ambiente reductor logrado por el tratamiento con 30mM de NAC.

figura 1 Evaluación actividad ROS de células U937 sometidas a fuerza centrífuga o fusionadas con PEG tratados o no con 30 mM de NAC Células U937 fueron sembradas en láminas óseas de origen bovino y cultivado por 12 horas, 1 día, 2 días, 4 días como control se utilizó células U937 en medio de cultivo. Las células sembradas en las láminas óseas fueron tratadas con DHE y hoechst por 15 minutos, se fijaron con paraformaldehído al 3,7% la intensidad media de fluorescencia fue cuantificada por el programa Image J. A 12 horas, B 1 día, C 2 días, D 4dias, E intensidad media de fluorescencia de cada uno de los grupos experimentales. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de al menos dos experimentos independientes realizados por duplicado. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); *= P <0.05 (significativo); **=P < 0.01 (muy significativo); *** = P<0.001 (altamente significativo).




SIN TRATAMIENTO
SIN TRATAMIENTO NAC
FUERZAS
FUERZAS NAC
PEG
PEG NAC
2 DIAS
4 dias


ACTIVIDAD ROS
INTENSIDAD MEDIA DE FLUORESCENCIA
60
40
20
0
***
12 horas
1 DIA
2 DIAS
4 DIAS
DIAS DE CULTIVO
MEDIO
MEDIO + NAC
FUERZAS
FUERZAS NAC
PEG
PEG NAC

7.2 EVALUACIÓN DE FUSIÓN

Para evaluar la fusión celular se utilizaron los reactivos Dio y DiD, estos se unen covalentemente a la membrana plasmática de las células que se dejan en contacto con ellos, la unión de DiO o DiD a la membrana plasmática causa un cambio conformacional en los reactivos permitiéndoles que a determinadas longitudes de onda sean fluorescentes, para evaluar la fusión celular se sembraron células U937 en láminas óseas de origen bovino y cultivadas durante 1, 2 y 4 días. Como control se utilizaron las células en medio de cultivo sin ningún tipo de estímulo o tratamiento (PEG, fuerzas compresivas o NAC).

Al evaluar la sobre posición (oevrlap) de imágenes en el grupo control se observa que esta es escasa, las células se observan aisladas unas de otras y en los pocos casos donde se observaron agrupadas la sobre posición no fue evidente, los cuerpos celulares individuales fueron de menor tamaño al observado cuando se fusionan las células U937 con PEG o se someten a fuerzas compresivas. El mismo comportamiento en el porcentaje de sobre posición de imágenes y tamaño de cuerpos celulares fue observado cuando las células fueron sembradas y tratadas con 30mM de NAC (figura 2).

En los grupos experimentales tratados con PEG se observa que desde el primer día de cultivo hay sobre posicionamiento de células y los cuerpos celulares son de mayor tamaño comparado con el grupo control (figura 2A), al segundo día de cultivo se observó que el área de las células tratadas con PEG triplican al área de los demás grupos experimentales y el porcentaje de fusión fue de 51,25%, estadísticamente significativo al contrastarlo con los otros grupos experimentales (figura 2B), al cuarto día de cultivo se observa que el tamaño de las células tratadas con PEG aumenta con respecto a las células tratadas con PEG evaluadas al segundo día de cultivo, de hecho el porcentaje de fusión es mayor (64,74%) (Figura 2C), las células fusionadas con PEG y tratadas con 30mM de NAC presentan un porcentaje de fusión 47 % y 50% a los dos y cuatro días de cultivo respectivamente, no obstante, el tamaño de esta fusión es menor al del grupo fusionado con PEG y no tratado con NAC (figura 2B, 2C), lo que indica que el ambiente reductor

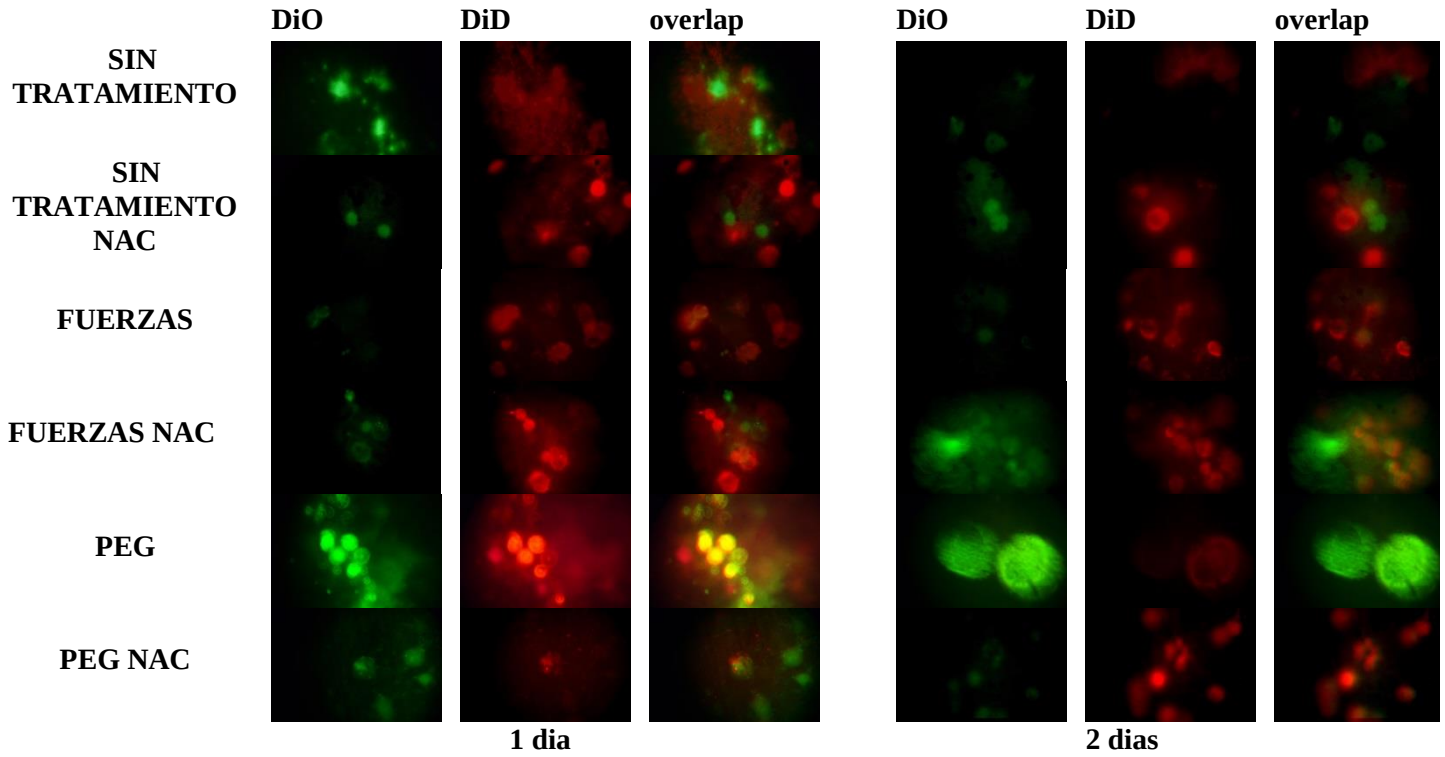
propiciado por NAC aunque no bloquea la fusión si disminuye el número de células fusionadas.

Las células sometidas a fuerza centrífuga muestran un aumento en el porcentaje de fusión a partir del cuarto día de cultivo 44% (figura 2C), a pesar de ello, el diámetro de las células comparado con el grupo control tan solo los duplica y no es comparable al observado en células fusionadas con PEG, en cuanto al comportamiento de las células sometidas a fuerzas centrifugas y tratadas con 30mM de NAC no se observa una diferencia estadísticamente significativa en la fusión comparada con las células sometidas a fuerza centrífuga y no tratadas con NAC a los días de cultivo evaluados ($P<0,05$).

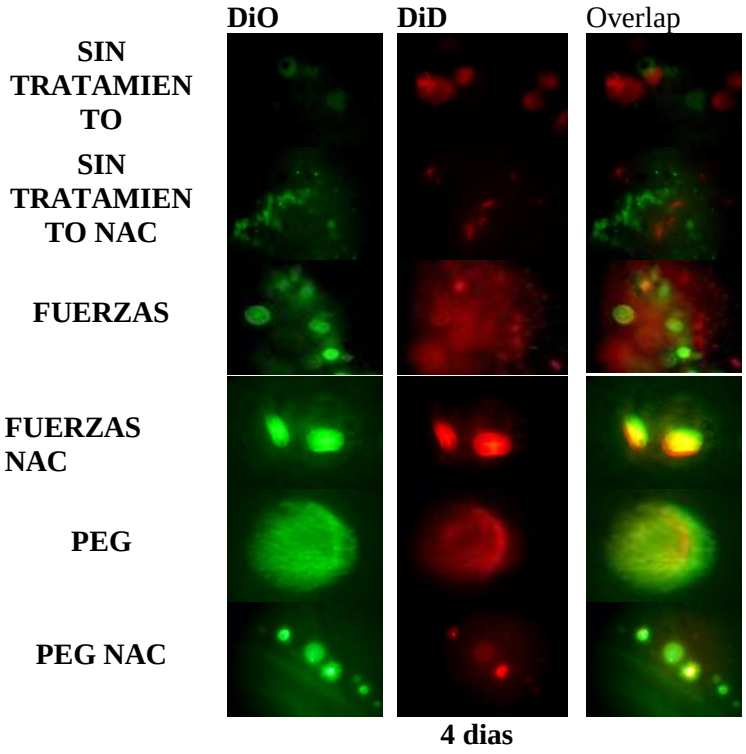
figura 2 Evaluación de fusión de células U937 en medio de cultivo, fusionadas con PEG o sometidas a fuerzas compresivas tratados o no con NAC. Células U937 fueron incubadas por 10 minutos con DiD o con DiO durante 10 minutos y sembradas en láminas óseas de origen bovino cultivadas durante 1, 2 o 4 días A, B y C respectivamente. Fijadas con paraformaldehído al 3,7% por 5 minutos, se analizó el porcentaje de fusión por medio del sobre posicionamiento de las células teñidas con DiD y con DiO D, Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de al menos dos experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de al menos dos experimentos independientes realizados por duplicado. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= $P>0.05$ (no significativo); *= $P<0.05$ (significativo); **=$P < 0.01$(muy significativo) ; *** = $P<0.001$ (altamente significativo).

A

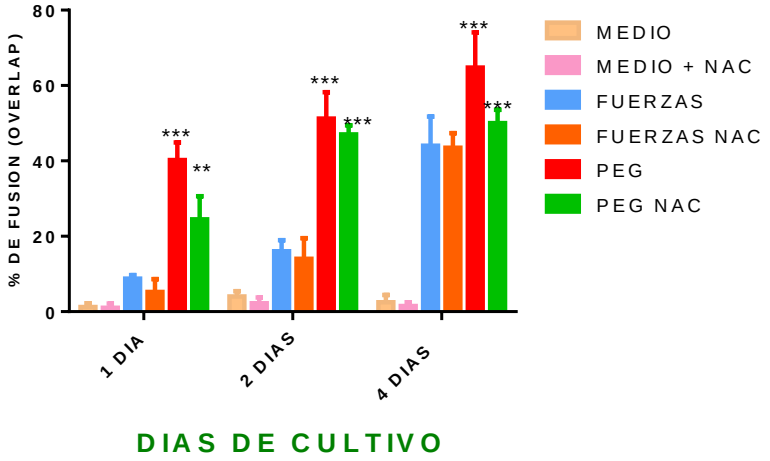
B


DiO
DiD
overlap
SIN TRATAMIENTO
SIN TRATAMIENTO NAC
FUERZAS
FUERZAS NAC
PEG
PEG NAC
1 dia
DiO
DiD
overlap
2 dias

C


DiO
DiD
Overlap
SIN TRATAMIENTO
SIN TRATAMIENTO NAC
FUERZAS
FUERZAS NAC
PEG
PEG NAC
4 dias

D


% DE FUSION (OVERLAP)
80
60
40
20
0
***
**
***
***
***
***
1 DIA
2 DIAS
4 DIAS
DIAS DE CULTIVO
MEDIO
MEDIO + NAC
FUERZAS
FUERZAS NAC
PEG
PEG NAC

7.3 EVALUACIÓN EXPRESIÓN TRAP

La enzima TRAP participa en la degradación de proteínas del hueso y es utilizada como un marcador de células similares a osteoclasto, para evaluar que una célula multinucleada sea TRAP+, esta debe presentar una coloración café, violeta o rojo ladrillo.

Al evaluar las células TRAP+ en el grupo control se observan células individuales de forma redondeada, aisladas de un tono rojo, el número de células TRAP+ fue de 8,75 $m.m^2$ y 6 $m.m^2$ a los 2 y 4 días de cultivo respectivamente, al cuantificar el número de células multinucleadas TRAP+ se contabilizaron 5.45 $m.m^2$, al contrastar células en medio de cultivo y tratadas con 30mM de NAC con el grupo control no se observaron diferencias estadísticamente significativas, indicando el mismo comportamiento morfológico y de tinción (figura 3A) ($P>0,05$).

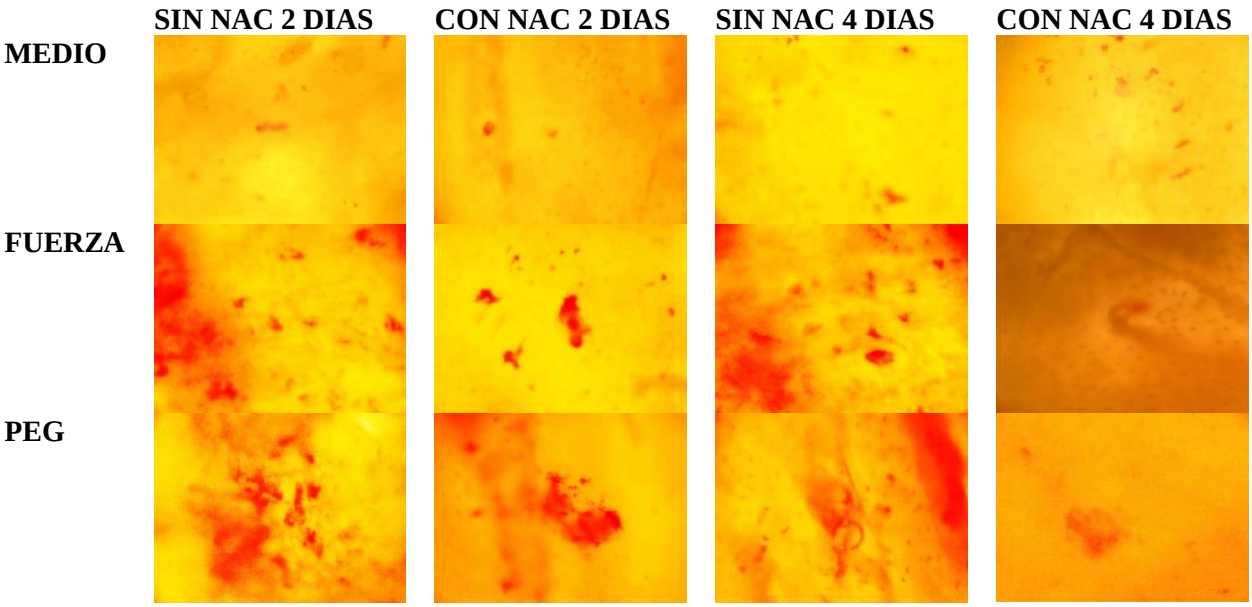
Las células fusionadas con PEG presentan cuerpos celulares de diferentes tamaños así como células individuales y agrupaciones con un tono rojo ladrillo asociados a células TRAP+, al contabilizar el número de células se obtuvo una media de 93,75$m.m^2$ y 138,5$m.m^2$ a los 2 y 4 días de cultivo respectivamente (figura 3B), en cuanto a las células multinucleadas TRAP+ sembradas en las láminas óseas, se aprecian agrupaciones con morfología irregular de tamaño grande y mediano, al cuantificar el número de células multinucleadas TRAP+ se encontró una media de 31,2$m.m^2$ y 31,9$m.m^2$ a los dos y cuatro días de cultivo respectivamente (figura 3C).

Las células fusionadas con PEG y tratadas con 30mM de NAC presentaron en su gran mayoría agrupaciones de tamaño pequeño, ya que, las agrupaciones celulares de tamaño grande y mediano (TRAP+ multinucleado) fueron escasas 9,75$m.m^2$ y 9,3$m.m^2$ a los 2 y 4 días de cultivo respectivamente, comparado con el grupo que se fusionó con PEG y no se trató con NAC.

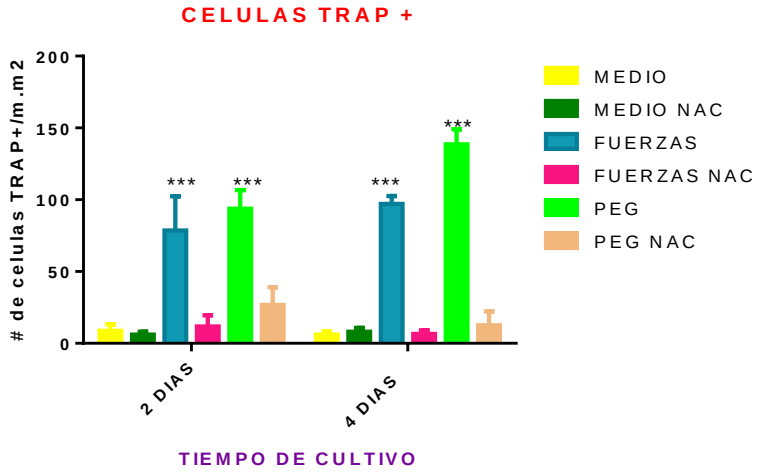
Al evaluar las células que fueron sometidas a fuerzas compresivas se observó que presentaron agrupaciones de diferentes tamaños, grandes, medianos y pequeños. El promedio de células TRAP+ fue de 78,5m.m^2 y 97m.m^2 a los dos y cuatro días de cultivo respectivamente, al cuantificar el número células multinucleadas TRAP+ se obtuvo un promedio de número de células de 16,3 m.m^2 y 18 m.m^2 figura 3C, al compararlas con células sometidas a fuerzas compresivas y tratadas con 30mM de NAC se observa una disminución en el número de células TRAP+ 11,75m.m^2 y 6.75m.m^2 a los 2 y 4 días de cultivo respectivamente, así mismo, el número de células multinucleadas TRAP+ 7,5m.m^2 y 8,6m.m^2, en estos dos casos se presentaron diferencias muy significativas (P<0,001) con respecto a las células sometidas a fuerzas centrifugas sin tratar con NAC.

Figura 3 Evaluación de la expresión de la enzima TRAP, células U937 sembradas sobre laminas óseas de origen bovino fusionadas con PEG, sometidas a fuerzas compresivas o sin ningún tipo de estímulo (grupo control) tratadas o no con NAC a los 2 y 4 días de cultivo, **A** imágenes representativas de láminas óseas teñidas para TRAP, **B** número de células TRAP + por m.m^2, **C** número de células multinucleadas TRAP+ por m.m^2, Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de al menos dos experimentos independientes realizados por duplicado. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); *= P <0.05 (significativo); **=P < 0.01(muy significativo) ; *** = P<0.001 (altamente significativo).

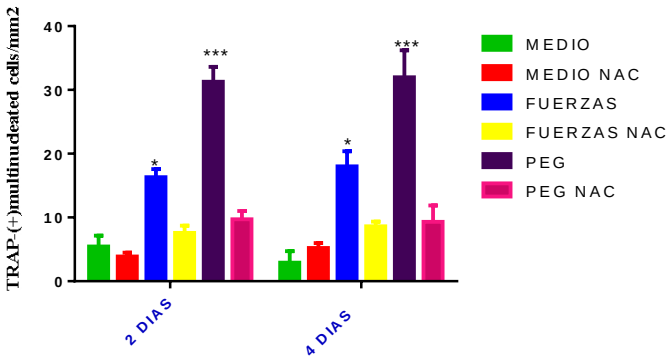
A


SIN NAC 2 DIAS
CON NAC 2 DIAS
SIN NAC 4 DIAS
CON NAC 4 DIAS
MEDIO
FUERZA
PEG

B


CELULAS TRAP +
de celulas TRAP+/m.m2
200
150
100
50
0
***
***
***
***
2 DIAS
4 DIAS
TIEMPO DE CULTIVO
MEDIO
MEDIO NAC
FUERZAS
FUERZAS NAC
PEG
PEG NAC

C


TRAP-(+)multinucleated cells/mm2
40
30
20
10
0
*
***
*
***
2 DIAS
4 DIAS
MEDIO
MEDIO NAC
FUERZAS
FUERZAS NAC
PEG
PEG NAC

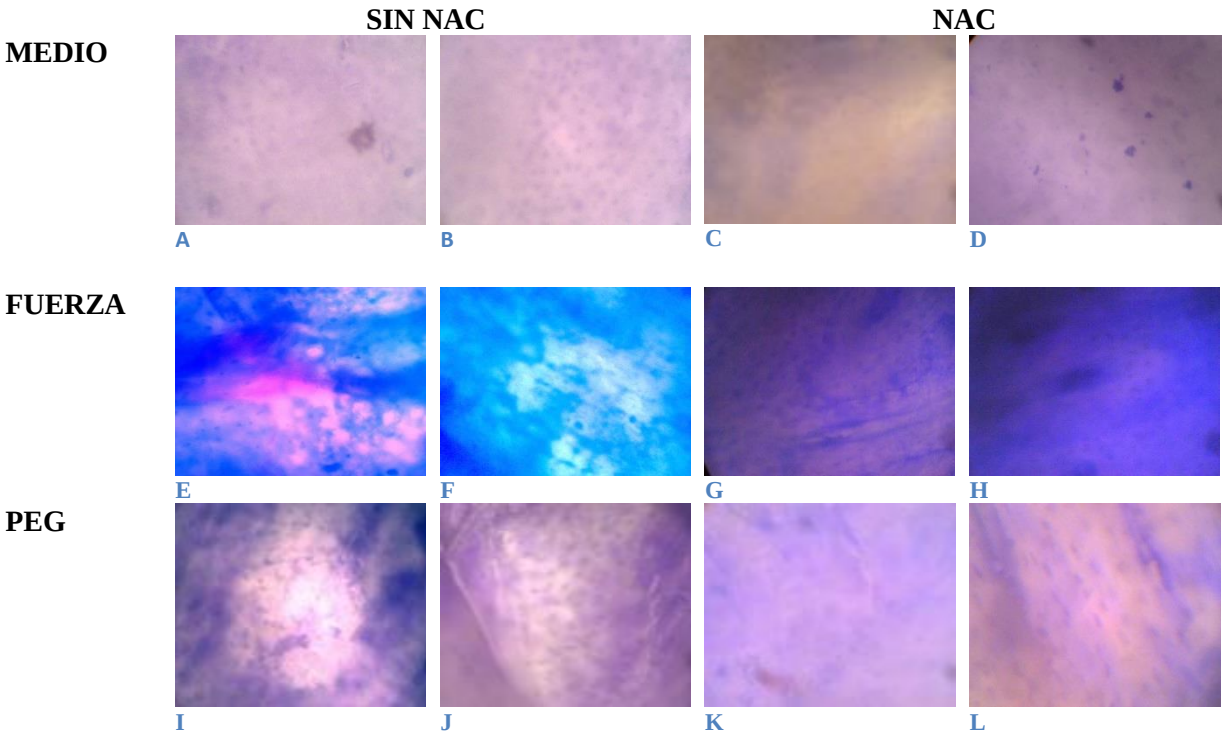
7.4 EVALUACIÓN ACTIVIDAD ANTIRESORTIVA DE NAC

Al determinar la actividad resortiva de las células U937 en medio de cultivo (grupo control) no se observan lagunas de resorción extensas, se observan algunos puntos de resorción de superficiales de poca magnitud (3,9% de resorción) figura 4A, 4B, en células en medio de cultivo y tratadas con 30mM NAC se observa el mismo comportamiento observado en el grupo control (figura 4C, 4D).

Al evaluar las lagunas de resorción realizadas por las células fusionadas con PEG se aprecia zonas de gran extensión sobre el campo óptico de bordes irregulares que en algunas ocasiones alcanzo a perforar el hueso (figura 4I,4J), al cuantificar el porcentaje de resorción se obtuvo un valor de 35,5% a los cuatro días de cultivo, el cual fue estadísticamente significativo contrastado con el grupo control (figura 4M), este comportamiento resortivo de las células fusionadas con PEG es inhibido por la adición de 30mM de NAC desde el inicio del cultivo, ya que en este grupo experimental se observan pequeños puntos de resorción que se presentan escasamente en las láminas óseas evaluadas (figura 4L,4M), el porcentaje de resorción de este grupo experimental (PEG mas NAC) fue de 12,3%.

Al someter las células a fuerzas compresivas por cuatro días se observan lagunas de resorción de poca extensión, de formas circulares con bordes bien definidos, en cuanto a las lagunas de resorción que se apreciaron de áreas extensas, estas se asociaron a resorciones cortas que se fueron uniendo de forma independiente; esto se sugiere a partir de los bordes claramente redondeados y definidos, así como de los putos de resorción individuales cerca a estas lagunas de resorción de gran extensión (figura 4E).

En cuanto a la profundidad de la resorción se observaron áreas de diferentes tonalidades asociadas a lagunas de diferentes profundidades (figura 4F), al evaluar el porcentaje de resorción se obtuvo un porcentaje de 35,5%, al someter las células U937 a fuerzas compresivas y tratarlas con 30mM NAC se observó que las lagunas de resorción disminuyeron (figura G, H), estas laminas presentaron pequeños puntos de resorción los cuales fueron escasos en las láminas evaluadas, con un porcentaje de resorción de 6,6%.


SIN NAC
NAC
MEDIO
FUERZA
PEG
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L

M

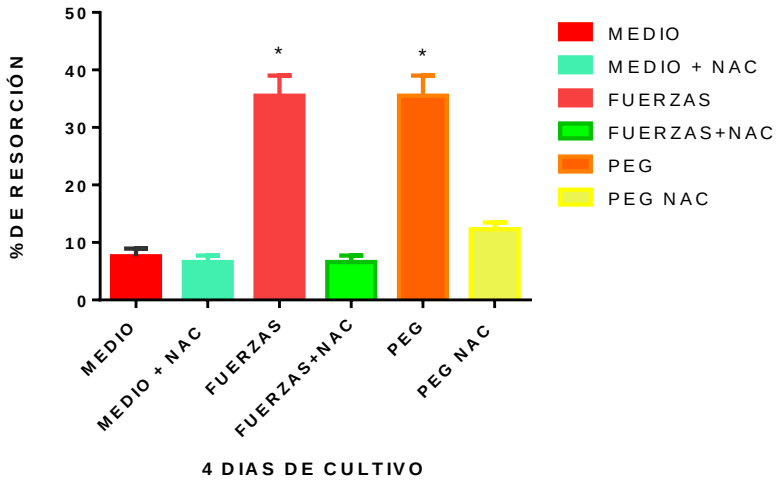

% DE RESORCIÓN
50
40
30
20
10
0
*
*
MEDIO
MEDIO + NAC
FUERZAS
FUERZAS+NAC
PEG
PEG NAC
4 DIAS DE CULTIVO

Figura 4 Actividad resortiva células U937 sembradas sobre láminas óseas de origen bovino fusionadas con PEG, sometidas a fuerzas compresivas o sin ningún tipo de estímulo (grupo control) tratadas o no con NAC, a los 4 días de cultivo las células fueron retiradas de las láminas y se tiñeron con azul de Commassie, observadas a 20X. A,B células en medio de cultivo. C,D células en medio de cultivo tratadas con 30mM de NAC. E,F células sometidas a fuerzas compresivas. G,H células sometidas a fuerza centrífuga tratadas con 30mM NAC. I,J células fusionadas con PEG. L,M células fusionadas con PEG tratadas con 30 mM de NAC. M cuantificación del porcentaje de resorción ósea. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de al menos dos experimentos independientes realizados por duplicado. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= $P>0.05$ (no significativo); *= $P<0.05$ (significativo); **=$P < 0.01$ (muy significativo); *** = $P<0.001$ (altamente significativo).

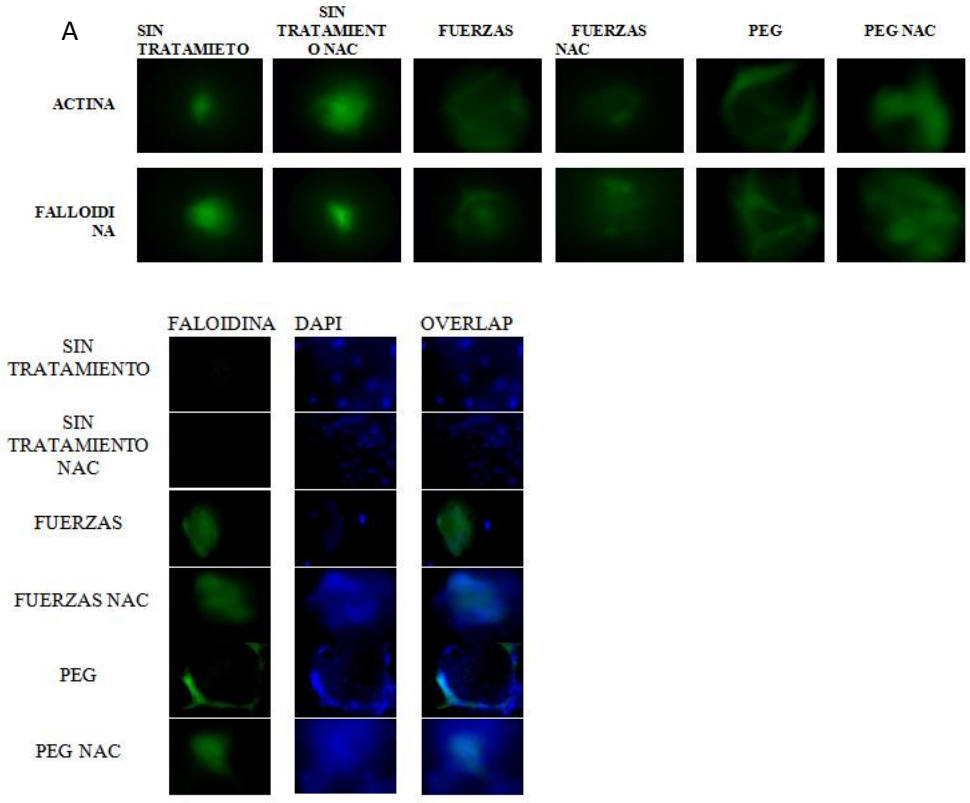
7.5 EVALUACIÓN DE PONDOSOMAS

La formación de anillos de actina es necesaria para que el osteoclasto inicie el proceso resortivo, este es un marcador morfológico de maduración osteoclástica, al evaluar el grupo control se apreció que las células positivas a fluorescencia se presentaron individualizadas, esta fluorescencia se evidencio de un aspecto condensado, sin embargo, la reorganización de esa actina no es periférica de forma ovalada o redondeada, el mismo comportamiento fue observado en células sin ningún tipo de estímulo y tratadas con 30mM de NAC (figura 5A).

Cuando se fusionaron células con PEG se observó estructuras fluorescentes periféricas encerradas de gran tamaño asociadas a la formación de anillos de actinas, las células fusionadas con PEG y tratadas con 30mM de NAC presentan características similares al grupo control en relación con la forma y distribución de la fluorescencia, sin embargo, el diámetro es mayor al compararlas con el grupo control, las células sometidas a fuerzas compresivas presentan las mismas características morfológicas de las células fusionadas con PEG, sin embargo, presentan un menor tamaño en cuanto a área o diámetro (figura 5A).

Al evaluar los anillos de actina con relación a la posición de los núcleos revelados con DAPI, se determinó que no es detectada fluorescencia asociada a la presencia de actina en

el grupo control, al examinar las células fusionadas con PEG se observó que los núcleos se ubican en la periferia o alrededor de la de actina revelada con falloidina, en cuanto a las células fusionadas con PEG y tratadas con 30mM de NAC se observó que los núcleos se extienden sobre toda la actina la cual se observa condensada asociada con una no polarización del citoesqueleto. Las células sometidas a fuerza centrífuga presentan un menor tamaño que las células fusionadas con PEG, sin embargo, se puede notar núcleos en la periferia de los cuerpos celulares positivos a actina, esta actina presenta una forma ovalado o circular asociada a la formación de pondosomas, al tratar las células sometidas a fuerzas compresivas con NAC se observa que esta organización descrita anteriormente no se observa, en cambio de esto se aprecia actina condensada en el cual se extienden los núcleos (figura 5B).



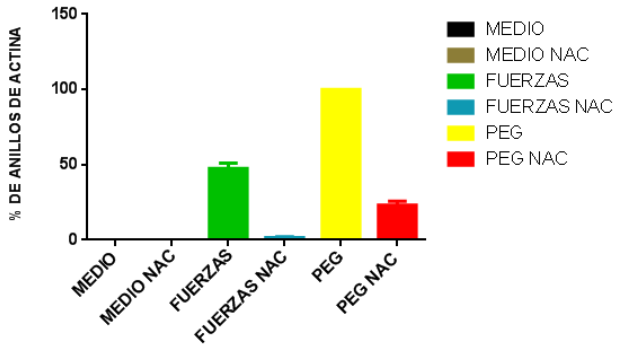


figura 5 .Anillos de actina, células U937 sembradas sobre láminas óseas de origen bovino fusionadas con PEG, sometidas a fuerzas compresivas o sin ningún tipo de estímulo (grupo control) tratadas o no con NAC, a los 4 días de cultivo, las células fueron fijadas y permeabilizadas con etanol:acido acético 50:50 por 24 horas a 4°C, posteriormente fueron incubadas con Falloidina o anti actina A, en otro experimento se sometieron a las mismas condiciones de fijación y permeabilización, se realizó marcaje de núcleos por medio de DAPI en combinación con falloidina B. Las láminas fueron observadas a 40X.

7.6 DETERMINACIÓN MARCADORES POBLACIONALES

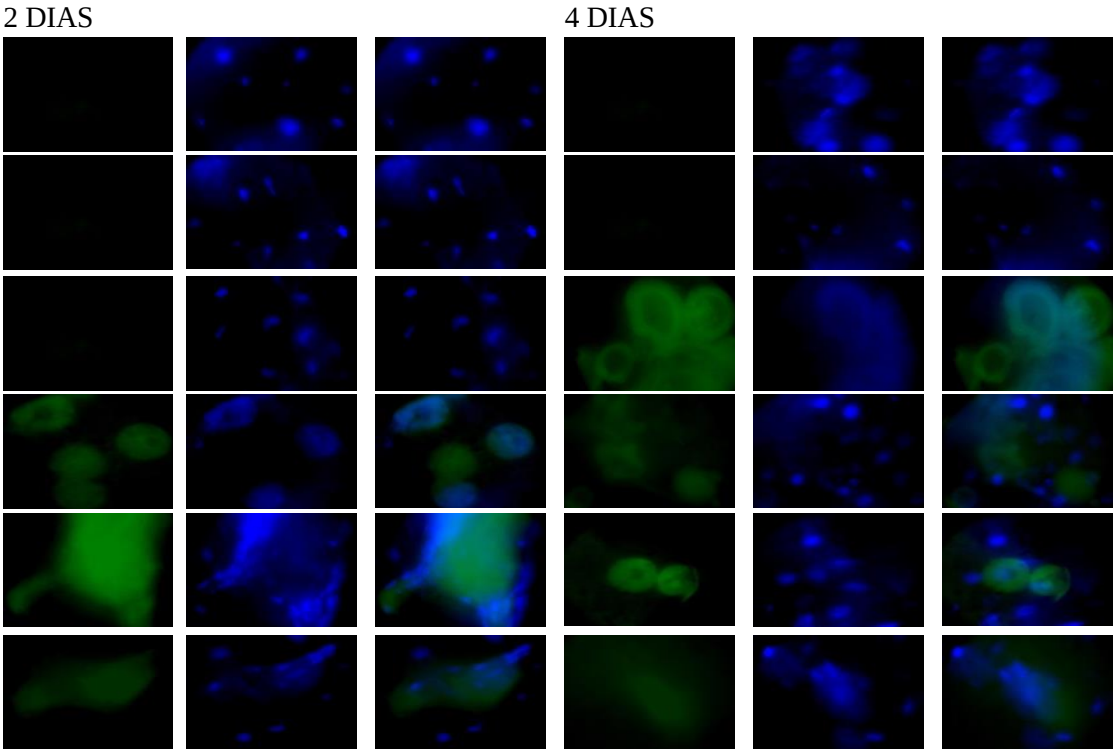
7.6.1 ANHIDRASA CARBONICA

Al evaluar la expresión de anhidrasa carbónica a los 2 y 4 días de cultivo no se observaron células fluorescentes al marcador en células U937 sembradas en láminas óseas de origen bovino en medio de cultivo (grupo control), cuando las células U937 se trataron con 30mM de NAC se observó el mismo comportamiento notado en el grupo control en los dos días de cultivo evaluados. Al fusionar las células U937 con PEG el porcentaje de células positivas al marcador fue de 41,25% y 45% a los 2 y 4 días de cultivo respectivamente (figura 6A), al fusionar con PEG y tratar con 30 mM de NAC el porcentaje de células positivas al marcador fue de 35,5% y 38% a los dos y cuatro días de cultivo respectivamente, no se evidencio diferencias significativas con las células fusionadas con PEG (ns= $P>0.05$) en ninguno de los dos días de evaluación (figura 6B).

En cuanto a las células U937 sometidas a fuerzas centrifuga estas presentaron un porcentaje de positividad bajo (4%) con respecto al grupo experimental fusionado con

PEG, a los dos días de cultivo, sin embargo, a los cuatro días de cultivo el valor de positividad cambio a 28,5%, muy significativo al ser contrastado con el grupo control (P< 0.001). Al tratamiento de este grupo experimental con 30 mM de NAC se observa un porcentaje de positividad de 22,75% y 22,5% a los 2 y 4 días de cultivo respectivamente, presentando una diferencia altamente significativa a los dos días de cultivo comparado con el grupo sometido a fuerza centrífuga y sin NAC (P<0.01), a pesar de ello, al cuarto día de cultivo comparado con el grupo sometido a fuerzas centrifugas sin NAC no se observaron diferencias estadísticamente significativas (P>0.05).

A



B

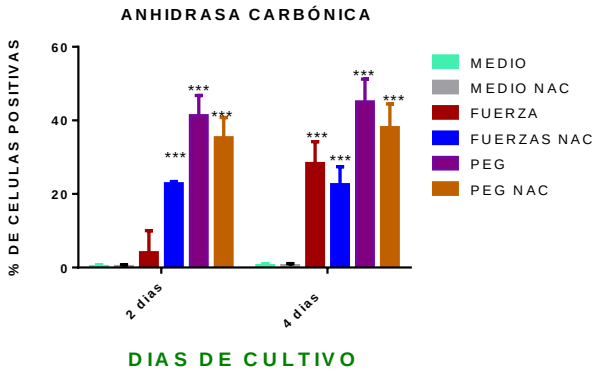


Figura 6. Inmunofluorescencia para anhidrasa carbónica, células U937 sembradas sobre láminas óseas de origen bovino fusionadas con PEG, sometidas a fuerzas compresivas o sin ningún tipo de estímulo (grupo control) tratadas o no con NAC, a los 2 y 4 días de cultivo, las células fueron fijadas con paraformaldehído 3,7% y permeabilizadas con triton al 0,1%, incubados con anti-anhidrasa carbonica, **A** fotografías representativas de fluorescencia de cada uno de los grupos evaluados, contrastados con hoechst, observados en un microscopio de fluorescencia 100x. **B**. porcentaje de positividad de las células al anticuerpo. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de al menos dos experimentos independientes realizados por duplicado. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); *= P <0.05 (significativo); **=P <0.01 (muy significativo); *** = P<0.001 (altamente significativo) respecto al grupo control.

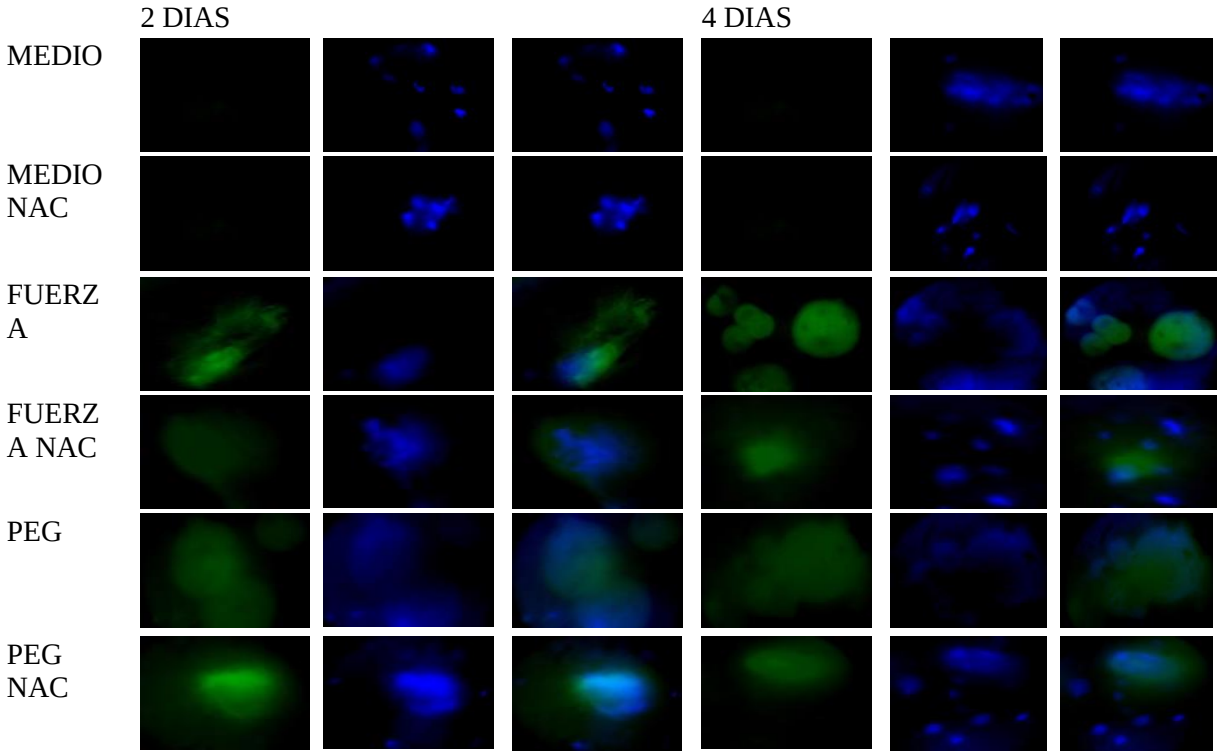
7.6.2 DC-STAMP

Al evaluar DC-STAMP se observa que las células sembradas en láminas óseas de origen bovino en medio de cultivo tratadas o no con NAC a los 2 y 4 días de cultivo fueron negativas para DC-STAMP, al fusionar células U937 con PEG se obtuvieron porcentajes de positividad de 38,2% y 43% a los 2 y 4 días de cultivo respectivamente, estas células positivas se encontraron en grandes masas de fluorescencia (figura 7A), con bordes irregulares. En las células U937 fusionadas con PEG y tratadas con 30mM de NAC el porcentaje de positividad fue de 21,3% y 26% a los dos y cuatro días de cultivo respectivamente, de hecho, mostraron una disminución estadísticamente muy significativa (P< 0,001) comparado con el grupo que solo se fusiono con PEG, se puede apreciar que en las células aisladas de un tamaño similar a las del grupo control estimado por la distribución de núcleos revelados con Hoesht DC-SATMP no fue positivo.

Las células U937 sometidas a fuerzas centrifuga presentaron un porcentaje de positividad de 27% y 40,6% a los dos y cuatro días de cultivo respectivamente, se observan células

positivas con bordes bien definidos en los cuales se puede distinguir los contornos de cada cuerpo celular (figura7A), al tratarlos con NAC el comportamiento morfológico es similar, sin embargo, se presentan diferencias estadísticamente significativas (P<0,001) al cuarto día de cultivo frente al grupo sometido a fuerzas compresivas y no tratado con NAC en el porcentaje de células positivas figura 7B.

A



B

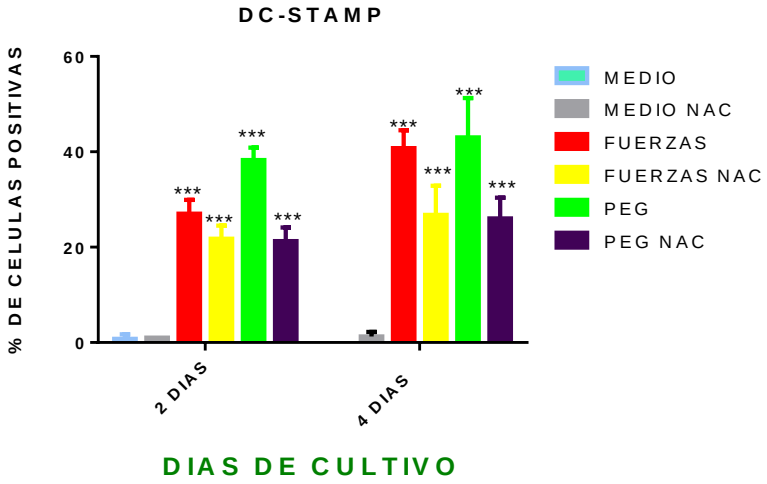


Figura 7. Inmunofluorescencia para DC-STAMP, células U937 sembradas sobre láminas óseas de origen bovino fusionadas con PEG, sometidas a fuerzas compresivas o sin ningún tipo de estímulo (grupo control) tratadas o no con NAC, a los 2 y 4 días de cultivo, las células fueron fijadas con paraformaldehído 3,7% y permeabilizadas con triton al 0,1%, incubados con anti-DC-STAMP, **A** fotografías representativas de fluorescencia de cada uno de los grupos evaluados, contrastados con hoechst, observados en un microscopio de fluorescencia 100x. **B**. porcentaje de positividad de las células al anticuerpo. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de al menos dos experimentos independientes realizados por duplicado. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); *= P <0.05 (significativo); **=P <0.01 (muy significativo); *** = P<0.001 (altamente significativo) respecto al grupo control.

7.6.3 RECEPTOR CALCITONINA

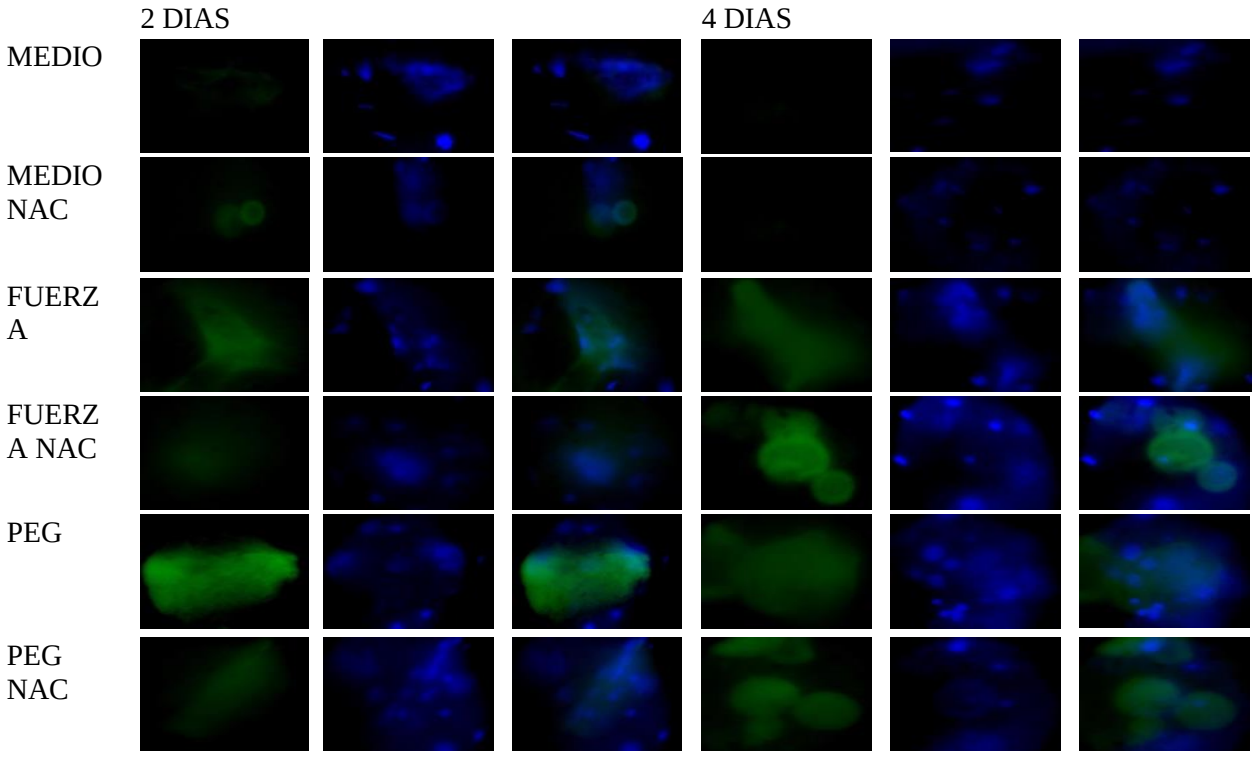
Al evaluar el receptor de calcitonina se observó que en el grupo control el porcentaje de células positivas al receptor de calcitonina fue cercano al 1% en los dos días de cultivo evaluados (2, 4 días), el porcentaje de células positivas al tratar células U937 con 30 mM de NAC sembradas en láminas óseas de origen bovino fue de 16% y 1,5% a los 2 y 4 días de cultivo respectivamente.

Cuando se fusionaron células U937 con PEG se determinaron porcentajes de positividad de 39% y 37,3% a los 2 y 4 días de cultivo respectivamente (figura 8B), al examinar las características morfológicas de las células fusionadas con PEG se notó masas fluorescentes de gran tamaño con bordes definidos y sin una forma uniforme, al fusionar con PEG y tratar con 30mM de NAC se observa que los cuerpos celulares disminuyen su tamaño asemejándose a las células sometidas a fuerzas compresivas tratadas con 30mM en los dos

días de cultivo (figura 8A), el porcentaje de células positivas al receptor de calcitonina fue de 21,5% y 23% a los 2 y 4 días de cultivo respectivamente, este valor fue inferior al determinado en el grupo fusionado con PEG, presentando en los dos días evaluados diferencias altamente significativas (P<0,001) (figura 8B).

Al evaluar las células U937 sometidas a fuerzas compresivas se apreció células positivas a la fluorescencia alargadas de un tamaño inferior al de las células fusionadas con PEG en los dos días de cultivo evaluados, así mismo, en las células positivas se observó núcleos en la periferia de las células, el porcentaje de positividad fue de 32% y 35% respectivamente (figura 8A), las células sometidas a fuerzas compresivas y tratadas NAC se observaron aisladas de una forma redonda u ovalada en los dos días evaluados, en el segundo día de cultivo presentan fluorescencia pero de una baja intensidad asociada a la baja expresión del receptor de calcitonina, al evaluar el porcentaje de células positivas se obtuvo porcentajes de 22% y 23% respectivamente, cuando se comparó con las células sometidas a fuerza centrífuga y no tratadas con NAC se obtuvieron diferencias significativas (P<0,05) a los dos días de cultivo y muy significativas (P<0,01) a los 4 días de cultivo (figura 8B).

A



B

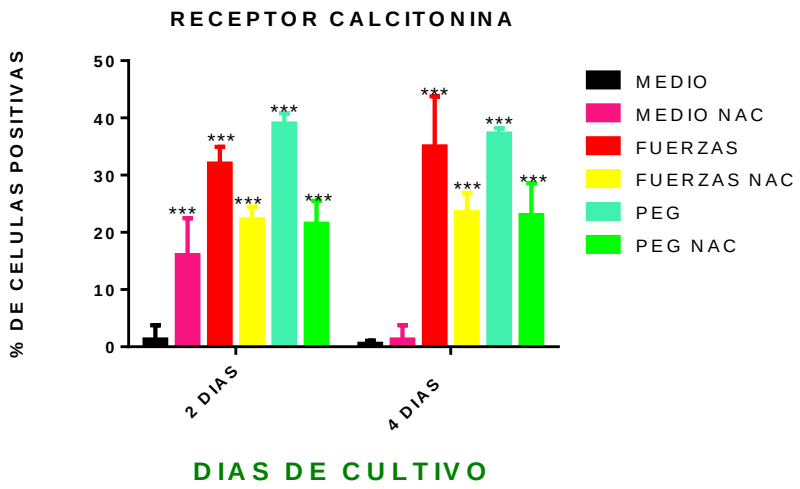


Figura 8. Inmunofluorescencia para receptor de calcitonina, células U937 sembradas sobre láminas óseas de origen bovino fusionadas con PEG, sometidas a fuerzas compresivas o sin ningún tipo de estímulo (grupo control) tratadas o no con NAC, a los 2 y 4 días de cultivo, las células fueron fijadas con paraformaldehído 3,7% y permeabilizadas con triton al 0,1%, incubados con anti-receptor de calcitonina, **A** fotografías representativas de fluorescencia de cada uno de los grupos evaluados, contrastados con hoechst, observados en un microscopio de fluorescencia 100x. **B**. porcentaje de positividad de las células al anticuerpo. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de al menos dos experimentos independientes realizados por duplicado. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); *= P <0.05 (significativo); **=P <0.01 (muy significativo); *** = P<0.001 (altamente significativo) respecto al grupo control.

7.6.4 INTEGRINA β3

La expresión de la integrina β3 fue realizada por medio de Inmunofluorescencia indirecta, las células U937 sembradas en láminas óseas de origen bovino en medio de cultivo (grupo control) son positivas para el marcador en un 23,2% a los 2 días de cultivo, presentan una morfología irregular, esta positividad fue observada en células las cuales estaban agrupadas, a pesar de ello, a los 4 días de cultivo no fue detectada la fluorescencia. Las células U937 en medio de cultivo y tratadas con 30mM de NAC no presentaron

fluorescencia para integrina β3 a los dos días de cultivo, sin embargo, al cuarto día de cultivo presentaron un porcentaje de positividad de 21,2%, las células positivas se observan de una forma ovalada con bordes definidos (figura 9A).

Al fusionar las células con PEG se observan cuerpos celulares de mayor tamaño a los observados en el grupo control, estas se presentan agrupadas con un porcentaje de positividad de 26% a los dos días de cultivo, no presentando diferencias significativas con el grupo control ($P>0.05$), al cuarto día de cultivo las células positivas a fluorescencia presentaron una positividad de 32,3% y una morfología similar a la observada a los dos días de cultivo, de hecho, las células fusionadas con PEG y tratadas con 30mM de NAC presentan una positividad de 24,4% y 25% a los dos y cuatro días de cultivo respectivamente. Las células fusionadas con PEG y tratadas con NAC al segundo día son de un tamaño menor al observado en células fusionadas con PEG, no presentan diferencias significativas al compararlas con células fusionadas con PEG y no tratadas con NAC en el segundo día de cultivo ($P>0,05$), aunque, se presentan diferencias significativas ($P<0,05$) al cuarto día de cultivo respecto al grupo fusionado con PEG.

Cuando se sometieron las células a fuerzas compresivas se observaron redondas, individuales con bordes bien definidos en los dos días de cultivo evaluados (2, 4 días), con porcentajes de positividad de 29% y 28% a los 2 y 4 días de cultivo respectivamente, solo presentan diferencias muy significativas a los cuatro días de cultivo comparado con el grupo control en ese tiempo de cosecha ($P<0,001$). Al tratamiento con NAC las células sometidas a fuerzas compresivas presentan la misma morfología que se observó cuando no se trataron con NAC, al evaluar el porcentaje de positividad este se determinó en 28% y 23% a los 2 y 4 días de cultivo respectivamente, al comparar este porcentaje con los del grupo experimental sometido a fuerzas compresivas y sin NAC se evidenciaron diferencias significativas al cuarto de cultivo ($P<0,05$) figura 9B.

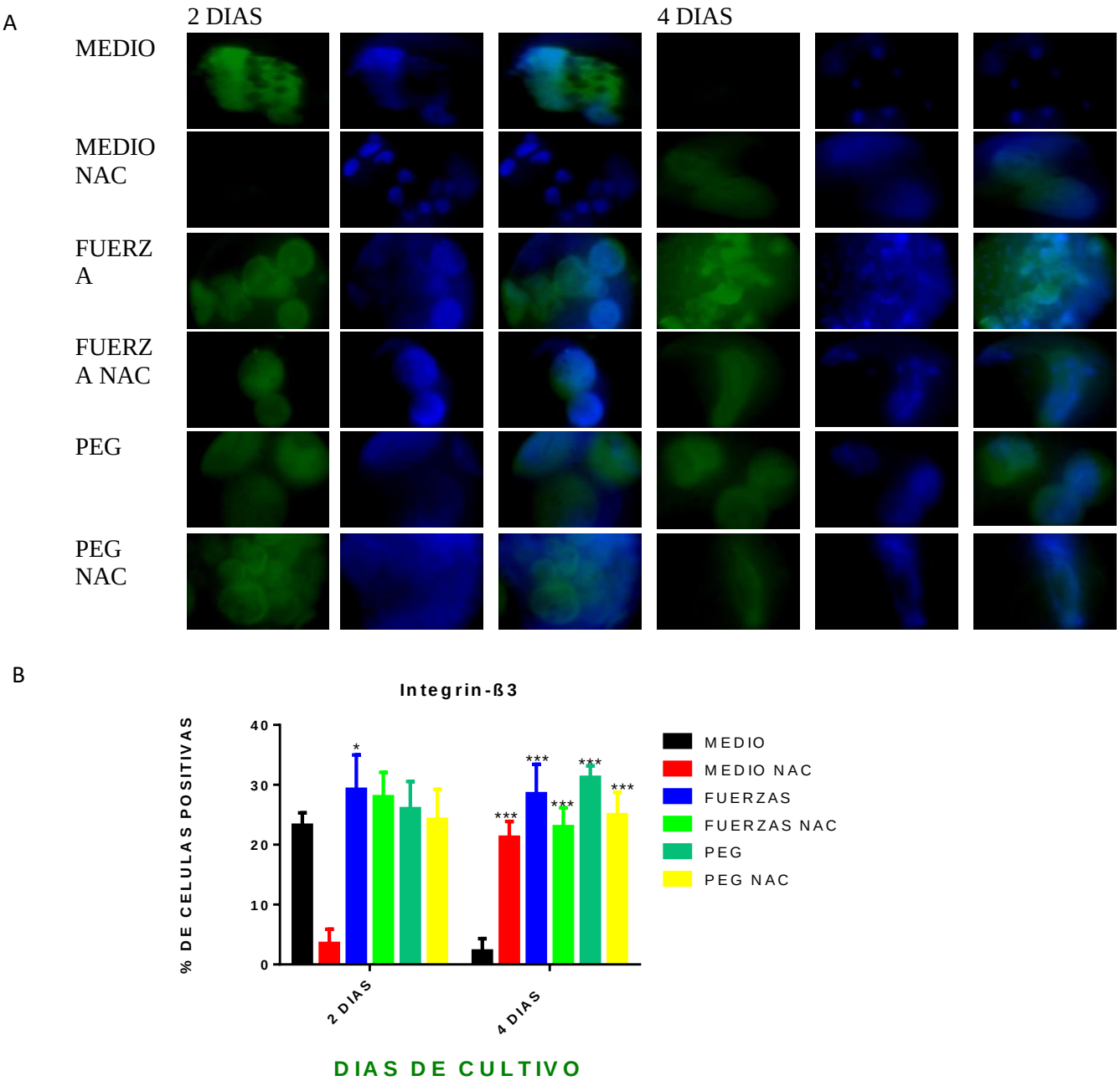


Figura 9. Inmunofluorescencia para integrina β3, células U937 sembradas sobre láminas óseas de origen bovino fusionadas con PEG, sometidas a fuerzas compresivas o sin ningún tipo de estímulo (grupo control) tratadas o no con NAC, a los 2 y 4 días de cultivo, las células fueron fijadas con paraformaldehído 3,7% y permeabilizadas con triton al 0,1%, incubados con anti-integrina β3 , **A** fotografías representativas de fluorescencia de cada uno de los grupos evaluados, contrastados con hoechst, observados en un microscopio de fluorescencia 100x. **B**. porcentaje de positividad de las células al anticuerpo. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de al menos dos experimentos independientes realizados por duplicado. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no

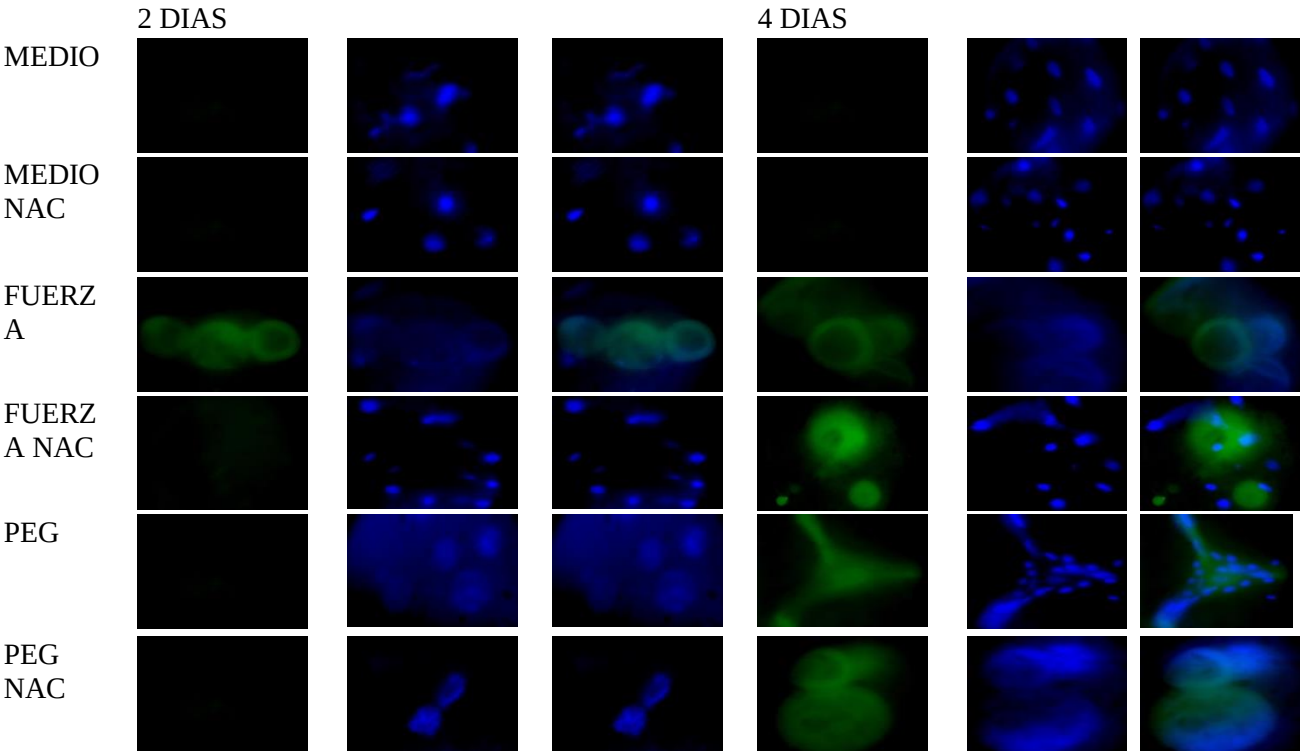
significativo); *= P <0.05 (significativo); **=P <0.01 (muy significativo); *** = P<0.001 (altamente significativo) respecto al grupo control.

7.6.5 MMP-9

La fluorescencia para MMP-9 no fue detectada en las células U937 sembradas en láminas óseas de origen bovino en medio de cultivo a los dos y cuatro días de cultivo, esta ausencia de fluorescencia asociada con la no expresión de MMP-9 también fue observada en células U937 tratadas con 30mM de NAC (figura 10A). Cuando se fusionan células U937 con PEG no se observa fluorescencia para MMP-9 en el segundo día de cultivo, al cuarto día de cultivo el grupo experimental fusionado con PEG presento una morfología alargada o estrellada con núcleos en la periferia, el porcentaje de positividad fue de 30% (figura 10B), en el grupo experimental el cual se fusiono con PEG y se trató con 30mM no fue detectada fluorescencia para el marcador al segundo día de cultivo, de hecho, al cuarto día de cultivo el porcentaje de positividad fue de 23,5%, al comparar las células fusionadas con PEG y tratadas o no con 30nM NAC no se observan diferencias estadísticamente significativas al cuarto día de cultivo (P>0,05) figura 10B.

Al someter células U937 a fuerzas compresivas se observan células positivas a fluorescencia para el marcador con morfología redondeada y bordes definidos en los dos días de evaluación (2 y 4 días) con un porcentaje de positividad de 27% y 24% a los dos y cuatro días de cultivo respectivamente, cuando las células son sometidas a fuerzas compresivas y tratadas con 30mM de NAC no se apreció positividad de fluorescencia a los 2 días de cultivo, sin embargo, al cuarto día de cultivo se observó células positivas para el marcador con una morfología redonda u ovalada, individuales de diferentes tamaños, el porcentaje de positividad fue de 22%, al comparar los grupos experimentales sometidos a fuerzas compresivas tratados o no con 30mM NAC a los cuatro días de cultivo no se observan diferencias estadísticamente significativas (P>0,05) figura 10B.

A



B

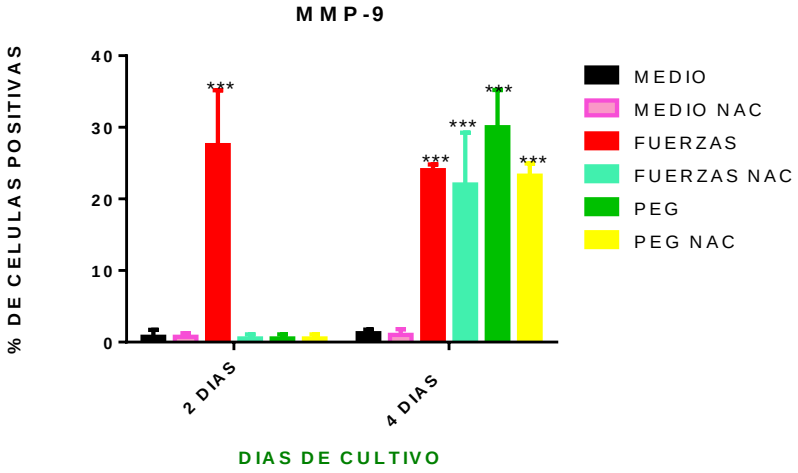


Figura 10. Inmunofluorescencia para MMP-9, células U937 sembradas sobre láminas óseas de origen bovino fusionadas con PEG, sometidas a fuerzas compresivas o sin ningún tipo de estímulo (grupo control) tratadas o no con NAC, a los 2 y 4 días de cultivo, las células fueron fijadas con paraformaldehído 3,7% y permeabilizadas con triton al 0,1%, incubados con anti-MMP-9 , **A** fotografías representativas de

fluorescencia de cada uno de los grupos evaluados, contrastados con hoechst, observados en un microscopio de fluorescencia 100x. **B**. porcentaje de positividad de las células al anticuerpo. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de al menos dos experimentos independientes realizados por duplicado. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); *= P <0.05 (significativo); **=P <0.01 (muy significativo); *** = P<0.001 (altamente significativo) respecto al grupo control.

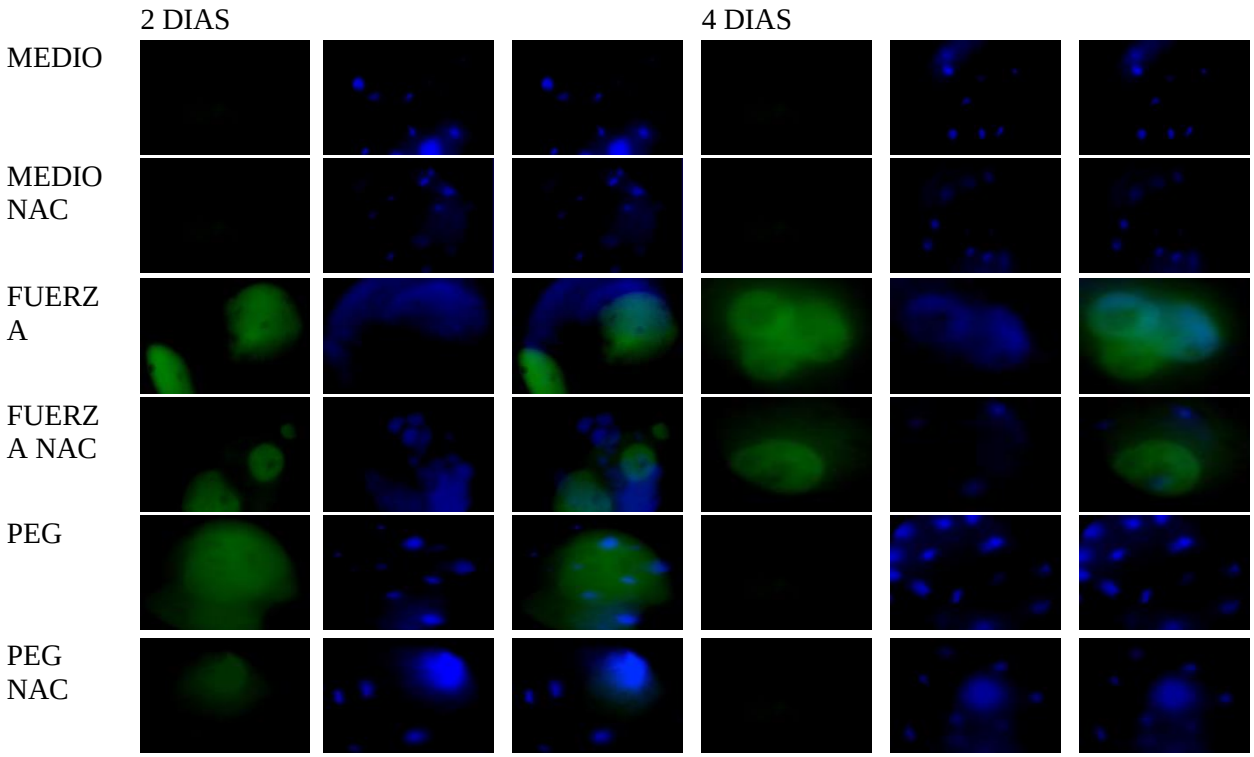
7.6.6 CATEPSINA K

La fluorescencia asociada a la expresión de catepsina K no fue detectable en células U937 sembradas en láminas óseas de origen bovino y tratadas o no con 30 mM NAC en los dos días de cultivo evaluados (2 y 4 días). Al fusionar con PEG se aprecian cuerpos celulares de gran tamaño, de forma y bordes irregulares a los dos días de cultivo, sin embargo, al cuarto día de cultivo no se observan células positivas para la fluorescencia asociadas a la no expresión de catepsina K en células U937 fusionadas con PEG. Cuando se fusiono con PEG y se trató con 30mM de NAC se obtiene un resultado similar al grupo experimental fusionada con PEG y no tratado con NAC en cuanto a la positividad de fluorescencia, ya que esta fue del 27% cuando se trataron con 30mM de NAC y del 26% cuando no fueron tratadas con NAC (FIGURA 11B), los cuales no presentaron diferencias estadísticamente significativas (P>0,05), no obstante, al fusionar con PEG y tratar con 30mM de NAC se distinguieron cuerpos celulares positivos a fluorescencia más pequeños, con bordes definidos y una forma regular o redondeada en la gran mayoría de células positivas identificadas, al recorrer el hueso se observó un intensidad de fluorescencia inferior al grupo experimental fusionado con PEG y no tratado con NAC (figura 11A).

Cuando se sometieron a fuerzas compresivas células U937 sembradas en láminas óseas de origen bovino se detectaron células positivas a fluorescencia en un porcentaje de 23,5% y 27,2% a los 2 y 4 días de cultivo respectivamente, estas células en los dos días evaluados se apreciaron de forma individual redondeadas con bordes bien definidos, el tratamiento de NAC bajo estas condiciones (fuerzas compresivas) no altero la expresión de catepsina K, los porcentajes de positividad fueron de 25% y 27% a los dos y cuatro días de cultivo respectivamente, cuando se comparan estos valores con los valores del grupo sometido a

fuerzas pero no tratados con 30mM de NAC no se estableció diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (P>0,05).

A



B

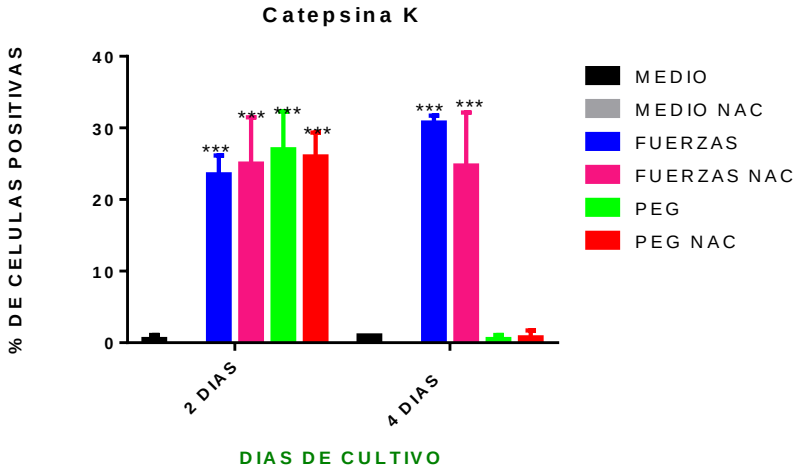


Figura 11. Inmunofluorescencia para Catepsina K, células U937 sembradas sobre láminas óseas de origen bovino fusionadas con PEG, sometidas a fuerzas compresivas o sin ningún tipo de estímulo (grupo control) tratadas o no con NAC, a los 2 y 4 días de cultivo, las células fueron fijadas con paraformaldehído 3,7% y permeabilizadas con triton al 0,1%, incubados con anti-Catepsina K , **A** fotografías representativas de fluorescencia de cada uno de los grupos evaluados, contrastados con hoechst, observados en un microscopio de fluorescencia 100x. **B**. porcentaje de positividad de las células al anticuerpo. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de al menos dos experimentos independientes realizados por duplicado. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); *= P <0.05 (significativo); **=P <0.01 (muy significativo); *** = P<0.001 (altamente significativo) respecto al grupo control.

7.6.7 SUBUNIDAD C1 DE LA ATPASA VACUOLAR H^+ VI (ATPC1)

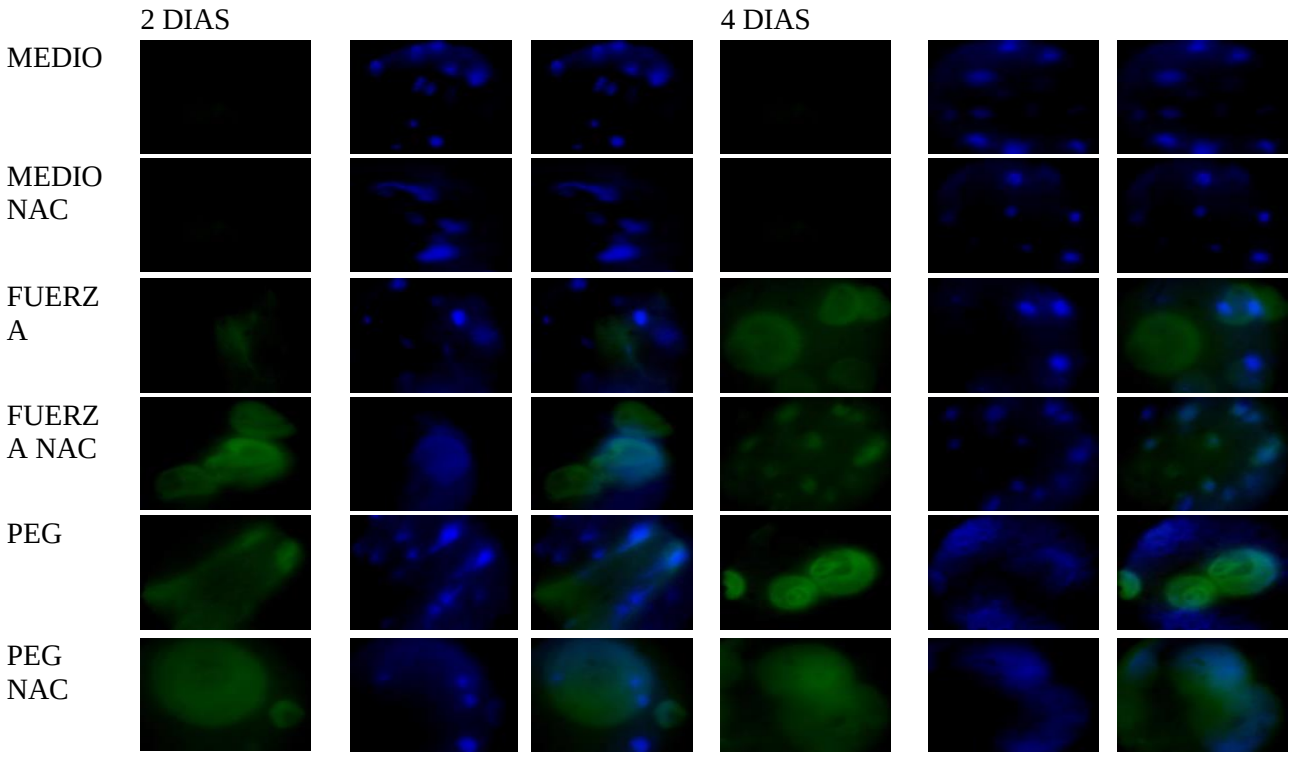
Al evaluar la expresión de ATPC1 en células U937 sembradas en láminas óseas de origen bovino en medio de cultivo, no fue detectada fluorescencia en ninguno de los campos ópticos evaluados tanto a los dos como cuatro días de cultivo, al tratar estas células con 30mM de NAC se observa un patrón similar al observado en el grupo control (células U937 cultivadas en medio) figura 12A, a pesar de ello, cuando se fusionaron células U937 con PEG a los dos días de cultivo se observa cuerpos positivos a fluorescencia de formas irregulares, esta fluorescencia solo se observó en masas celulares de gran tamaño, en células individuales no se observaron células positivas a fluorescencia, a los cuatro días de cultivo se observa que la positividad de fluorescencia observada en su mayoría fue en células con una morfología redonda de bordes definidos las cuales se notaron agrupadas, frente al porcentaje de fluorescencia se determinó que fue del 28% y 28,5% a los dos y cuatro días de cultivo respectivamente.

Al fusionar células U937 con PEG y luego tratarlas con 30mM se observa que en los dos días evaluados las células positivas a fluorescencia se aprecian de morfología redondeada con una heterogeneidad en su área o diámetro celular, el porcentaje de positividad a los dos días de cultivo fue de 21,7% , cuando se comparó con el grupo fusionado con PEG y no tratado con NAC a los dos días de cultivo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (P>0,05), de igual manera, a los cuatro días de cultivo tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas (P>0,05) al comparar células fusionadas con PEG tratadas o no con NAC (figura 12B).

Las células U937 sometidas a fuerzas compresivas presentaron un porcentaje de positividad de fluorescencia de 13% y 30% a los dos y cuatro días de cultivo respectivamente, a los dos días de cultivo se observó que las células sometidas a fuerzas centrifuga presentaron diferencias significativas ($P<0,05$) comparadas con el grupo control, en cuanto a su morfología se observó que tan solo las células aisladas e individuales fueron positivas a fluorescencia, a pesar de ello, a los cuatro días de cultivo se observa que ese patrón descrito anteriormente cambia y la fluorescencia se presenta en cuerpos celulares de tamaño variable e individuales.

Cuando se sometieron células U937 a fuerzas centrifuga y se trató con 30mM de NAC a los dos de cultivo se observan que en las células positivas a fluorescencia se presentan individuales, redondeadas con bordes regulares, con un porcentaje de positividad de 28% estadísticamente muy significativo al compararlo con el grupo experimental sometido a fuerzas centrifugas y no tratado con NAC ($P<0,001$), por otro lado, a los cuatro días de cultivo se observa que las células positivas a fluorescencia son de tamaños heterogéneos de hecho siempre se presentan en cuerpos celulares individuales, al comparar el porcentaje de positividad con el grupo sometido a fuerzas centrifugas y no tratado con NAC, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P>0,05$) figura 12A.

A



B

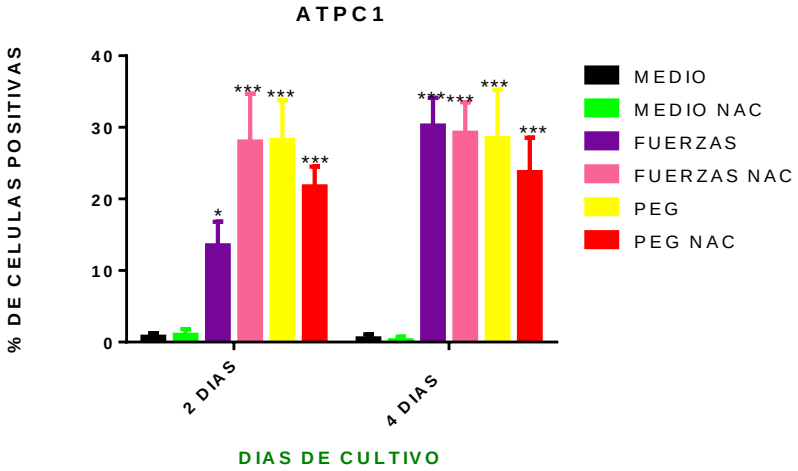


Figura 12. Inmunofluorescencia para ATPC1, células U937 sembradas sobre láminas óseas de origen bovino fusionadas con PEG, sometidas a fuerzas compresivas o sin ningún tipo de estímulo (grupo control) tratadas o no con NAC, a los 2 y 4 días de cultivo, las células fueron fijadas con paraformaldehído 3,7% y permeabilizadas con triton X-100 al 0,1%, incubados con anti- ATPC1 , **A** fotografías representativas de fluorescencia de cada uno de los grupos evaluados, contrastados con hoechst, observados en un microscopio de fluorescencia 100x. **B**. porcentaje de positividad de las células al anticuerpo. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de al menos dos experimentos independientes realizados por duplicado. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no

significativo); *= P <0.05 (significativo); **=P <0.01 (muy significativo); *** = P<0.001 (altamente significativo) respecto al grupo control.

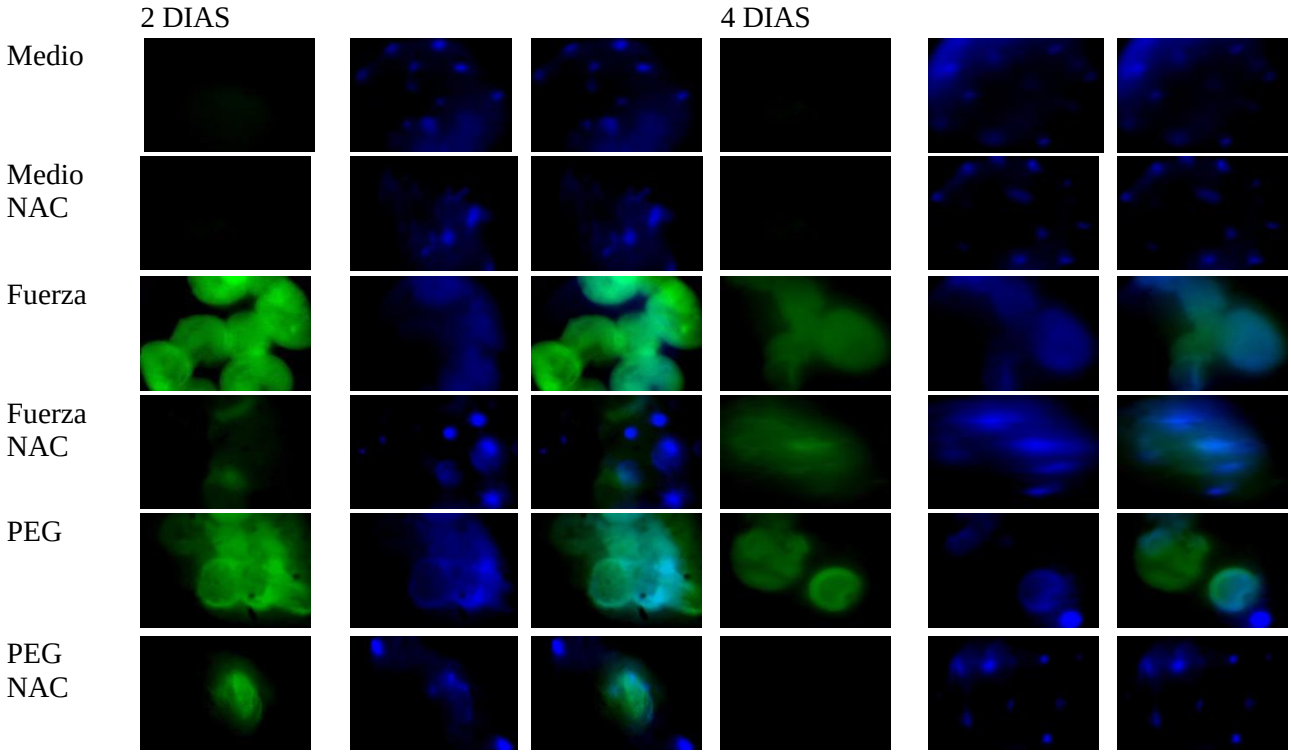
7.6.8 ADAM 12

En cuanto a la expresión de ADAM 12 en células U937 sembradas en láminas óseas de origen bovino y cosechado en medio de cultivo por dos y cuatro días, se observó que en los campos ópticos evaluados la fluorescencia fue nula, cuando las células U937 fueron fusionadas con PEG y sembradas en la laminas óseas de origen bovino se apreciaron células positivas a fluorescencia para ADAM 12, estas células tienen una morfología redonda en la cual los cuerpos celulares se observaron contornos definidos, de hecho, estas se presentaron en agrupaciones, en cuanto a los porcentajes de positividad fueron de 24% y 25% a los dos y cuatro días de cultivo respectivamente (figura 13A), cuando se fusionaron las células con PEG y se trataron con 30 mM de NAC no se observaron células positivas a los cuatro días de cultivo, sin embargo, a los 2 días de cultivo el número de células positivas fue de 22,5% estas células positivas se presentaron de una forma redonda de un tamaño inferior al visto en el grupo experimental que fue fusionado con PEG pero que no se trató con NAC, en cuanto al porcentaje de positividad para el segundo día de cultivo no se presentaron diferencias estadísticamente significativas comparado con el grupo experimental fusionado con PEG (P>0,05) figura 13B.

Las células U937 sometidas a fuerzas compresivas y positivas a fluorescencia para ADAM12 se observan individuales de forma redondeada u ovalada en los dos días de cultivo evaluados (2 y 4 días), frente al porcentaje de positividad de fluorescencia este fue de 23% y de 27% a los dos y cuatro días de cultivo respectivamente, cuando las células fueron sometidas a fuerzas compresivas y tratadas con 30mM de NAC, las células positivas a fluorescencia se observaron de un tamaño menor al observado en células sometidas a fuerzas compresivas sin NAC, al segundo día de cultivo el porcentaje de positividad fue de 17%, si se confronta con el valor de positividad del grupo experimental sometido a fuerzas compresivas sin NAC se obtuvo que no hubo diferencias estadísticamente significativas (P>0,05) figura 13 B, frente al cuarto día de cultivo se determinó un porcentaje de positividad de 21,5% el cual no fue estadísticamente

significativo frente a las células sometidas a fuerzas compresivas y no tratadas con NAC (P>0,05) figura 13B.

A



B

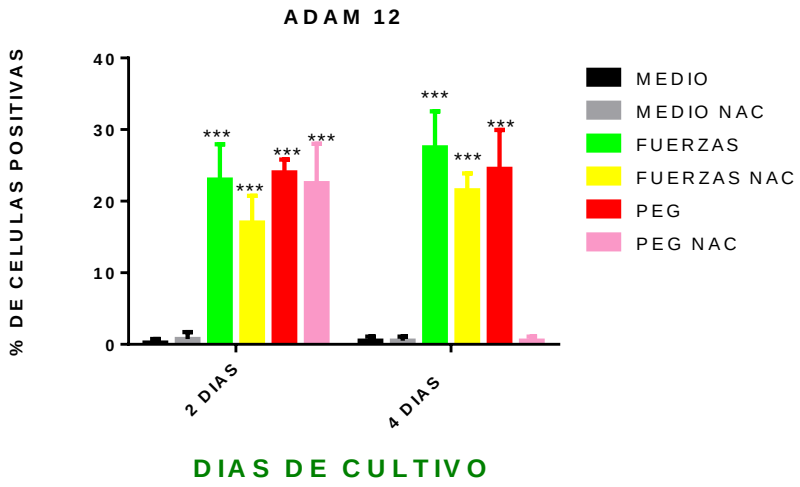


Figura 13. Inmunofluorescencia para ADAM 12, células U937 sembradas sobre láminas óseas de origen bovino fusionadas con PEG, sometidas a fuerzas compresivas o sin ningún tipo de estímulo (grupo control) tratadas o no con NAC, a los 2 y 4 días de cultivo, las células fueron fijadas con paraformaldehído 3,7% y permeabilizadas con triton X-100 al 0,1%, incubados con anti- ADAM-12 , **A** fotografías representativas de fluorescencia de cada uno de los grupos evaluados, contrastados con hoechst, observados en un microscopio de fluorescencia 100x. **B**. porcentaje de positividad de las células al anticuerpo. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de al menos dos experimentos independientes realizados por duplicado. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); *= P <0.05 (significativo); **=P <0.01 (muy significativo); *** = P<0.001 (altamente significativo) respecto al grupo control.

7.6.9 NFKβ-p

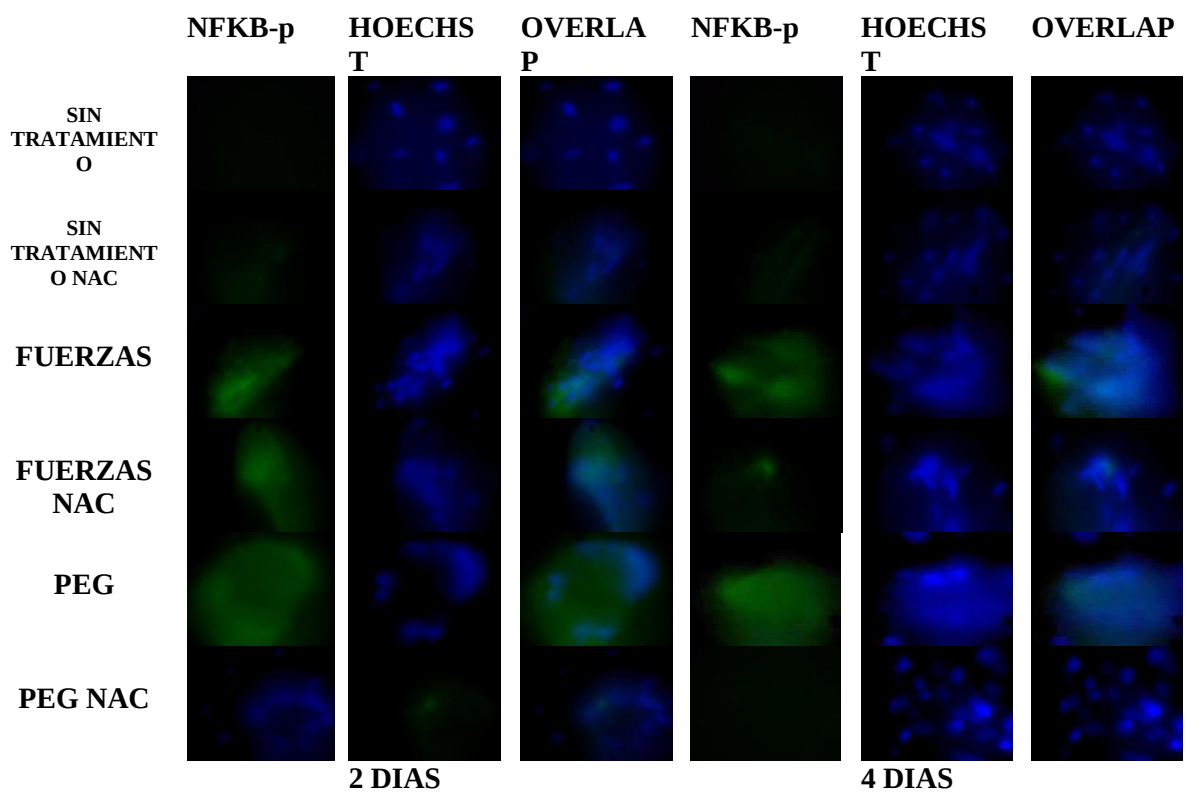
Al evaluar la presencia de NFKβ-p en células U937 sembradas en láminas óseas de origen bovino no se observaron células positivas a fluorescencia en ninguno de los campos ópticos evaluados, esta positividad para NFKβ-p fue determinada a los 2 y 4 días de cultivo, bajo las condiciones descritas anteriormente y al ser tratadas con 30mM NAC se observan un porcentaje de positividad del 3,3%, estas se encontraron aisladas y su intensidad de fluorescencia fue baja (figura 14A), en cuanto a las células U937 fusionadas con PEG estas se observaron de forma irregular y agrupadas, al segundo día de cultivo las células positivas a la fluorescencia fue del 41,7% las cuales presentan núcleos en la periferia de los cuerpos celulares, a los cuatro días de cultivo se observaron masas fluorescentes de forma irregular, en estas masas no se observa una distribución definida de los núcleos los cuales se presentan extendidos en todo el cuerpo celular (figura 14A).

Las células fusionadas con PEG y tratadas con 30mM de NAC presentan porcentajes de positividad de 3,2% y 3% a los dos y cuatro días de cultivo respectivamente, los dos días de evaluación de NFKβ-p (2 y 4 días) presentan diferencias muy significativas con el grupo que se fusiono con PEG y no se trató con NAC (P>0,001) figura 14B. Al fusionar con PEG y tratar con NAC se observa una heterogeneidad en la distribución de los núcleos revelados con hoechst, algunos se presentan agrupados, otros individualizados y en algunos campos evaluados se observó núcleos organizados dando un apariencia de “anillo” a la organización de los núcleos.

En cuanto al grupo experimental sometido a fuerzas centrifugas se observa que las células positivas a fluorescencia se distinguieron en su mayoría como agrupaciones en las cuales los núcleos revelados con hoechst se observaron individuales, los porcentajes de positividad fueron de 37,5% y 31,7% a los dos y cuatro días de cultivo respectivamente, presentando diferencias muy significativas frente al grupo control (P>0,05), figura 14B.

Al someter células U937 a fuerzas compresivas y tratarlas con 30mM de NAC se observó que al segundo día de cultivo el porcentaje de células positivas a fluorescencia fue del 24%, al compararlo con células U937 sometidas a fuerzas compresivas se determinó que hubo diferencias significativas entre estos dos grupos evaluados (P<0,05), figura 14B, la fluorescencia observada al segundo día de cultivo disminuye al cuarto día de cosecha, ya que, se determinó un porcentaje de células positivas del 10,3%, estas se observan aisladas sin importar si se presentan en núcleos individuales o agrupados.

A



B

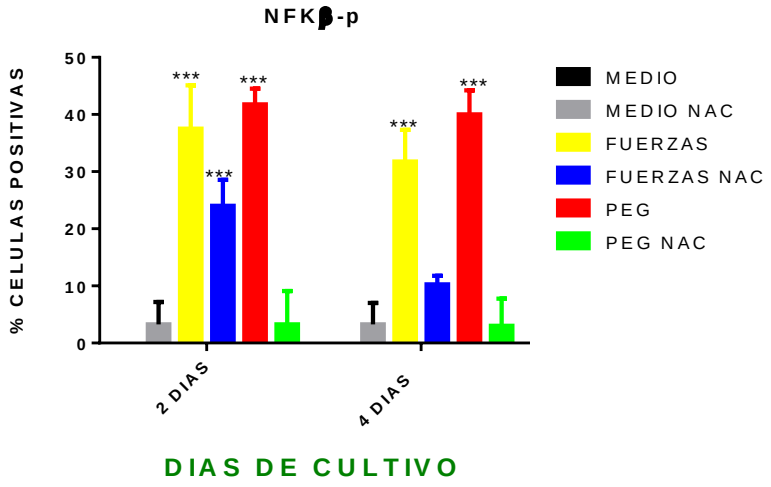


Figura 14. Inmunofluorescencia para NFKβ-p, células U937 sembradas sobre láminas óseas de origen bovino fusionadas con PEG, sometidas a fuerzas compresivas o sin ningún tipo de estímulo (grupo control) tratadas o no con NAC, a los 2 y 4 días de cultivo, las células fueron fijadas con paraformaldehído 3,7% y permeabilizadas con triton X-100 al 0,1%, incubados con anti- NFKβ-p , **A** fotografías representativas de fluorescencia de cada uno de los grupos evaluados, contrastados con hoechst, observados en un microscopio de fluorescencia 100x. **B**. porcentaje de positividad de las células al anticuerpo. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de al menos dos experimentos independientes realizados por duplicado. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); *= P <0.05 (significativo); **=P <0.01 (muy significativo); *** = P<0.001 (altamente significativo) respecto al grupo control.

8. DISCUSIÓN

Las técnicas o métodos para tradicionales para obtener osteoclastos demandan el uso de hormonas (CSF y RANKL) o de cocultivos celulares (osteoblastos con progenitores ostoeclásticos) estos métodos demandan tiempo y algunos costos,[84] de hecho, ninguno de estos métodos ha podido clarificar el efecto que tiene las fuerzas compresivas en progenitores osteoclásticos, en el presente trabajo se descrito el efecto que tiene un antioxidante como NAC en células similares a osteoclasto obtenidas por fusión con PEG o fuerza centrífuga, este trabajo describe como se obtienen células con capacidad resortiva al fusionar con PEG o al someter a fuerzas compresivas células U937, y como esta activad resortiva se ve atenuada por el uso de 30mM de NAC.

Para tener claridad sobre el efecto de NAC en los grupos experimentales se evaluaron los niveles ROS, este nivel mostro diferencias respecto al grupo control a las 12 horas de cultivo en las células fusionadas con PEG teniendo una máxima intensidad de fluorescencia a las 24 horas asociada al aumento de ROS, en cuanto a las células sometidas a fuerzas compresivas estas aumentaron los niveles de intensidad de fluorescencia a los dos días de cultivo y teniendo un máximo a los cuatro días de cultivo, en los dos grupos experimentales tratados con NAC los niveles ROS no mostraron diferencias estadísticamente significativas contrastadas con el grupo control a los dos y cuatro días de cultivo ($P>0,05$).

Se ha reportado en la literatura que al tratar pre osteoclastos con RANKL aumenta la concentración intracelular de ROS[85,86,6] y que ese aumento intracelular de ROS es necesario para impulsar la diferenciación hacia osteoclasto, este aumento ROS en la diferenciación hacia osteoclasto es atribuida a NAPH oxidasa (Noxs), activada probablemente por una pequeña guanosín trifosfato (GTPasa) Rac 1, componente citosólico de Noxs[87] activado por el receptor del factor de necrosis tumoral asociado a factores (TRAF6) que ejerce su actividad fisiológica por la activación de RANK por RANKL,[6] a pesar de ello, la forma bioquímica en la cual estos niveles ROS aumentaron en los grupos experimentales no fueron evaluadas en el presente trabajo.

El aumento en los niveles ROS en células U937 fusionadas con PEG o sometidas a fuerzas compresivas crónicas de baja magnitud indica que en nuestros dos modelos experimentales

reportados[18,17] de obtención de células similares a osteoclasto poseen al igual que los modelos de obtención convencionales el aumento de los niveles ROS, y que este aumento es crítico para adquirir características similares a osteoclasto, el aumento de ROS desde el primer periodo de evaluación (12 horas) en células fusionadas con PEG acompañado de lo reportado sobre el número de células TRAP+ a las 12 horas pos-fusión con PEG por Murillo(2010),[18] sugiere que la fusión aumenta los niveles ROS, y que al tratamiento con un antioxidante como NAC pueda disminuir el porcentaje de células fusionadas.

Para corroborar la anterior afirmación se diseñó un ensayo en el cual se pudiese determinar la fusión, para tal fin se usaron dos marcadores lipófilos DiD y DiO, los cuales se incubaron previamente por separado en células U937, así al unir los dos grupos de células U937 pre incubados con DiD o DiO, sembrarlos y someterlos a los diferentes grupos experimentales se podría tener una idea sobre la fusión ocurrida al tratar con PEG o someter a fuerzas compresivas con o sin 30mM de NAC, para ello se evaluó el porcentaje de células sobrepuestas a las dos longitudes de onda en las cuales emite fluorescencia DiD y DiO, este porcentaje se tomó como el porcentaje de fusión. Las células sin PEG y sin fuerzas (grupo control) no experimentan cambios en sus porcentajes de fusión independientemente de si son o no tratadas con NAC, las células fusionadas con PEG presentan valores significativos de fusión frente a los otros grupos experimentales desde el primer día de cultivo, en este sentido se observó que las células fusionadas con PEG fueron aumentando el tamaño conforme pasaron los días de cultivo, al tratamiento con NAC el porcentaje de fusión fue similar al observado al tratar con PEG, aun así, el tamaño de los cuerpos celulares positivos para las dos fluorescencias se mantuvo igual en el grupo fusionado con PEG y tratado con 30mM de NAC, indicando que en un ambiente reductor se disminuye la eficiencia de fusión en células U937 fusionadas con PEG .

De hecho, los valores de porcentaje de fusión y niveles ROS concuerdan con lo reportado en cuanto a número de células TRAP+ multinucleadas al fusionar células U937 con PEG[18], el cual alcanza un numero constante y significativamente mayor a partir del primer día post tratamiento con PEG con respecto al control.

En cuanto a las células sometidas a fuerzas compresivas tratadas o no con NAC alcanzan un máximo de fusión al cuarto día de evaluación, a pesar de ello, no alcanzan el tamaño

visto cuando se fusiono con PEG (figura 2D), indicando que en las células sometidas a fuerzas centrifugas ocurre fusión y que esta es de baja eficiencia comparada con la vista en PEG, de hecho, el mayor porcentaje de fusión visto (cuarto día de cultivo) concuerda con el valor más alto en la intensidad de fluorescencia asociada a ROS (figura 1E), esto unido a que no se encontraron diferencias cuando se trataron o no con NAC en cuanto al porcentaje de fusión, sugiere que la fusión dada bajo estas condiciones (fuerzas compresivas) no sean dependiente de ROS.

Después de determinar el número de células TRAP+ se determinó el número de células multinucleadas TRAP+, en este caso el número de células positivas multinucleadas TRAP+ del grupo fusionado con PEG (31,6 y 32,9 a los dos y cuatro días) dobla el número TRAP+ multinucleado de células sometidas a fuerzas centrifugas (16,3 y 18 a los dos y cuatro días de cultivo), al ser sometidas a fuerzas compresivas y tratarlas con 30 mM de NAC, disminuye el número de células multinucleadas TRAP+ y no presentan diferencias significativas respecto al grupo control.

La fosfatasa acida resistente a tartrato (TRAP o TRACP) es expresada en osteoclastos y en células presentadoras de antígeno como lo son macrófagos, TRAP es capaz de producir ROS por una reacción de Fenton en la cual se producen altas concentraciones de radical hidroxilo (OH*),[88] los ROS producidos por TRAP son capaces de degradar colágeno tipo I, la diferencia entre el pH optimo entre la fosfatasa acida (pH 4) y la generación de ros (pH neutro) sugiere que estas dos actividades de TRAP dependen del compartimiento celular donde estén, así como del pH en el que se encuentre.[89]

Para la evaluación de TRAP se realizó la cuantificación del número de células positivas TRAP, asi como del número de células multinucleadas TRAP, en cuanto al número de células TRAP se obtuvieron diferencias muy significativas ($P<0,001$) entre el grupo experimental tratado con PEG o sometido a fuerzas centrifugas, con respecto a los otros grupos experimentales y el grupo control, de hecho, bajo estos dos tratamiento en la presencia de 30mM de NAC el número de células TRAP no tuvo diferencias estadísticamente significativas con el grupo control ($P>0,05$), lo que sugiere dos posibilidades; NAC suprima la expresión de TRAP o que NAC suprima la actividad fosfatasa por cambiar el pH acido inducido por bomba vacuolar H+ATPasa en el dominio

de resorción o que el dominio de resorción no se haya formado impidiendo las condiciones de pH necesarias que se presentan en el dominio de resorción para la actividad fosfatasa, a pesar de que ninguna de estas posibilidades fue evaluada. Hasta el momento no se han reportado investigaciones en las cuales se evalué el efecto directo de un antioxidante como NAC sobre la función de la bomba de protones en osteoclastos.

El número de células positivas TRAP+ en los grupos control o tratados con NAC del presente trabajo puede obedecer a que como se ha reportado la activación de NFKβ es dependiente de los niveles ROS en células llevada a diferenciación osteoclástica,[7,90,6] en este trabajo se evidencio los bajos niveles ROS comparadas con células tratas con PEG o sometidas a fuerzas compresivas sin NAC (figura 1E). Se ha determinado que el mensajero de TRAP es expresado en pre osteoclastos llevados a diferenciación osteoclástica por el tratamiento de RANKL, esta expresión de TRAP es dosis dependiente de RANKL,[91] lo descrito anteriormente sugiere que la baja expresión de TRAP en células U937 fusionadas con PEG o sometidas a fuerzas compresivas tratadas con NAC sea por la baja o nula expresión de TRAP por la no activación de NFKβ a causa de la baja concentración ROS, sin embargo, el mensajero de TRAP no fue evaluado.

La característica más importante en células similares a osteoclasto es la capacidad resortiva, en este trabajo las células U937 tiene capacidad resortiva al someterse a fuerzas compresivas o al fusionarse con PEG, aunque las características morfológicas de las lagunas de resorción presentes en las láminas óseas de origen bovino en estos dos grupos experimentales presentan patrones diferentes.

En cuanto a las lagunas observadas en las láminas óseas de origen bovino en las cuales se sembraron células tratadas con PEG se apreciaron de bordes irregulares de gran extensión con respecto al campo óptico del microscopio, en cambio las lagunas óseas presentes en láminas óseas en las cuales se sembraron células U937 y se sometieron a fuerzas compresivas se observaron con bordes de forma redonda, en donde se observó áreas pequeñas y grandes de resorción en los campos ópticos evaluados, de hecho, las lagunas de resorción de gran extensión se especula que están formados por la suma de varios puntos de resorción, las diferentes tonalidades de azul asociadas a diferentes densidades de resorción ósea acompañado por su forma redonda soporta esta afirmación.

La capacidad resortiva vista en células tratadas con PEG o sometidas a fuerzas se asemejo a la del grupo control al tratar bajo estas condiciones con 30mM de NAC, este efecto puede ser atribuido a la no expresión de la enzima TRAP en estas condiciones experimentales, ya que la enzima es capaz de hidrolizar fosfoproteínas como la osteopontina y silaoproteínas óseas de la matriz extracelular mineralizada del tejido oseo.[92] Por otro lado se ha reportado que en vacuolas que contienen la enzima TRAP en osteoclastos se han encontrado fragmentos de colágeno tipo I y cristales de hidroxiapatita. [89]

Otra posibilidad en la disminución de la actividad antiresortiva de las células fusionadas con PEG o sometidas a fuerzas compresivas tratadas con NAC es la no formación de pondosomas (figura 5), ya que en este sentido la actina en estas células bajo condiciones reductoras (tratamiento con NAC) o en algunos casos el grupo control se observó condensada o como se ha reportado organizada en "nubes" (cloud), la cual es actina en dos estados; monomérico y polimerizado en el citoplasma, después de esto la actina ya polimerizada se expande para formar anillos de pondosomas este último es un intermediario entre el estado de nube y el de campana, en el estado estructural de campana los pondosomas son formados en la periferia del anillo esto causa que el anillo se expanda a la periferia celular. [93]

Esta estructura de pondosoma en la periferia celular se evidencio al fusionar células U937 con PEG o cuando se sometieron a fuerzas compresivas, donde sus núcleos también se observaron en la periferia celular (figura 5B), es posible que no se hayan detectado anillos de pondosomas ya que esta estructura no es estable en el tiempo el cual se ha reportado que es de 30 minutos mientras que el de campana de pondosoma ha sido reportado de 1 a 12 horas,[94] esta disposición en la ubicación de núcleos en esta estructura de campana ya ha sido reportada como indicativo de maduración del pondosoma de campana,[95,96] lo anterior indica que en un ambiente reductor como el que propicia NAC se bloquee el paso de la estructura de pondosoma de nube al de campana, a pesar de ello, el cómo se interrumpe

este paso no fue evaluado en esta trabajo, posiblemente sea por la disminución en la detección de NFKβ-p.

Al evaluar NFKβ en su forma activa (NFKβ-p) se detectó fluorescencia asociada a la presencia de NFKβ-p en las células U937 sometidas a fuerzas centrifugas o tratadas con PEG, no obstante, en las células que fueron cultivadas bajo estas condiciones y tratadas con 30mM de NAC la fluorescencia disminuyo significativamente con respecto al tratamiento sin NAC (fuerzas más NAC 2 día de cultivo) o fue indetectable, asemejándose a lo que se observó en el grupo control, indicando que el tratamiento con NAC disminuye la activación de NFKβ (figura 14).

Se ha reportado que el estado redox celular regula la activación de NFKβ en osteoclastos y monocitos a través de la dineina LC8, esta última cambia su conformación según este reducida u oxidada, al estar reducida expone dominios de unión para la subunidad inhibitoria de NFKβ (IKβα), esta unión al inhibidor impide su fosforilación, no obstante, cuando se aumentan los niveles ROS LC8 es oxidado cambiando su conformación estructural y así mismo su unión a la IKβα, esto permite que IKBα sea fosforilado por IKK y degradado por proteosoma, así NFKβ se puede translocar al nucleo.[90]

En cuanto a los marcadores poblacionales los únicos marcadores evaluados y presentes en el grupo control o en medio de cultivo y tratadas con NAC fueron: el receptor de calcitonina a los dos días de cultivo en células en medio de cultivo tratadas con NAC, integrina β3 al segundo día de cultivo en el grupo control, de hecho, al someter a fuerzas o tratar con PEG todos los marcadores evaluados en el presente trabajo se expresaron al menos en un día de los tiempos de cultivo evaluados sin depender si se trató o no con NAC, pese a que no se detectó o los porcentajes de positividad fueron bajos de NFKβ-p en el grupo control o cuando las células fueron tratadas con PEG o sometidas a fuerzas y tratadas con NAC, algo que es de tener en cuenta es que en ningún momento se evalúo función de estos marcadores, la disminución en la capacidad resortiva cuando se trata con NAC podría sugerir de algún modo se esté afectando la función de estos marcadores.

9. CONCLUSIONES

Fusionar células con PEG o someterlas a fuerzas centrifugas aumentan las concentraciones intracelulares de ROS acompañado por la expresión de la enzima TRAP y la actividad resortiva, estas concentraciones de ROS disminuyeron al tratar con 30 mM de NAC acompañado por la disminución de la actividad resortiva y el número de células TRAP+, indicando la importancia del aumento de las concentraciones intracelulares ROS en la función y diferenciación hacia osteoclasto en los dos modelos experimentales evaluados en el presente trabajo.

El potencial de fusión es diferente según la técnica experimental utilizada, no es claro aún si la fusión vista en el modelo experimental de fuerzas sea por el agrupamiento en la siembra o por la habilidad de las células bajo estas condiciones en migrar y fusionarse.

10.PERSPECTIVAS

Evaluar si el aumento de ROS en células similares a osteoclasto obtenidas por fusión con PEG o por someter a fuerzas se dé por la acción de NADPH oxidasa y determinar que isótipo de Nox se expresa en los diferentes progenitores utilizados (fibroblastos gingivales, células U937 y CMSP).

Evaluar la expresión mediante PCR en tiempo real de los marcadores osteoclásticos TRAP, Catepsina K, anhidrasa carbónica II, Receptor de Calcitonina, ATPasa vacuolar H+, DC-STAMP, OC-STAMP en los modelos experimentales presentados en este trabajo antes y después del estímulo (fusión con PEG o fuerzas compresivas).

Evaluar si algunas de las moléculas involucradas en el modelo fusión célula-virus están involucradas en la fusión que ocurre en la diferenciación hacia osteoclasto utilizando los modelos experimentales llevados a cabo en este trabajo, así poder proponer posteriormente estrategias que disminuyan la fusión en células.

11.BIBLIOGRAFÍA

1. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science*. 2000;289:1504-1508. doi:10.1126/science.289.5484.1504.

2. Väänänen K. Mechanism of osteoclast mediated bone resorption - Rationale for the design of new therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005:959-971. doi:10.1016/j.addr.2004.12.018.

3. Salo J, Lehenkari P, Mulari M, Metsikkö K, Väänänen HK. Removal of osteoclast bone resorption products by transcytosis. *Science*. 1997;276(5310):270-273. doi:10.1126/science.276.5310.270.

4. Meikle MC. Remodeling the Dentofacial Skeleton : The Biological Basis of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2006;86(1):12-25.

5. Wise GE, King GJ. Mechanisms of Tooth Eruption and Orthodontic Tooth Movement. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2008;87(5):414-434.

6. Lee NK, Choi YG, Baik JY, et al. A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. *Blood*. 2005;106(3):852-859. doi:10.1182/blood-2004-09-3662.Supported.

7. Hong S, Huh J-E, Lee SY, Shim J-K, Rhee SG, Jeong W. TRP14 Inhibits Osteoclast Differentiation via Its Catalytic Activity. *Mol Cell Biol*. 2014;34(18):3515-3524. doi:10.1128/MCB.00293-14.

8. Ueno T, Yamada M, Igarashi Y, Ogawa T. N-acetyl cysteine protects osteoblastic function from oxidative stress. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2011. doi:10.1002/jbm.a.33211.

9. Yamada M, Tsukimura N, Ikeda T, et al. N-acetyl cysteine as an osteogenesis-enhancing molecule for bone regeneration. *Biomaterials*. 2013. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.04.064.

10. Ji H, Liu Y, Zhao X, Zhang M. N-acetyl-L-cysteine enhances the osteogenic

differentiation and inhibits the adipogenic differentiation through up regulation of Wnt 5a and down regulation of PPARG in bone marrow stromal cells. *Biomed Pharmacother*. 2011. doi:10.1016/j.biopha.2011.04.020.

11. Ji HJ, Lee SH, Han BK, et al. N-acetylcysteine stimulates osteoblastic differentiation of mouse calvarial cells. *J Cell Biochem*. 2008. doi:10.1002/jcb.21508.

12. Toker H, Ozdemir H, Eren K, Ozer H, Sahin G. N-acetylcysteine, a thiol antioxidant, decreases alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol*. 2009. doi:10.1902/jop.2009.080509.

13. Toker H, Ozdemir H, Balci H, Ozer H. N-acetylcysteine decreases alveolar bone loss on experimental periodontitis in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Periodontal Res*. 2012. doi:10.1111/j.1600-0765.2012.01497.x.

14. Kim DY, Jun JH, Lee HL, et al. N-acetylcysteine prevents LPS-Lnduced pro-inflammatory cytokines and MMP2 production in gingival fibroblasts. *Arch Pharm Res*. 2007. doi:10.1007/BF02980269.

15. K. Diercke, S. Sen, A. Kohl CJL, Erber and R. Compression-dependent Up-regulation of Ephrin-A2 in PDL Fibroblasts Attenuates Osteogenesis. *J Dent Res*. 2011;90(9):1108-1116. doi:10.1177/0022034511413926.

16. Irie N, Takada Y, Watanabe Y, et al. Bidirectional Signaling through EphrinA2-EphA2 Enhances Osteoclastogenesis and Suppresses Osteoblastogenesis. *J Biol Chem*. 2009;284(21):14637-14644. doi:10.1074/jbc.M807598200.

17. PAZOS LEIDY BIBIANA GC. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD RESORTIVA DE CELULAS FIBROBLASTOIDES (CULTIVO PRIMARIO GINGIVAL) LUEGO DE SOMETERLAS A FUERZA CENTRIFUGA O FUSIONARLAS CON PEG". 2013.

18. Murillo A, Guerrero CA, Acosta O, Cardozo CA. Bone resorptive activity of osteoclast-like cells generated in vitro by PEG-induced macrophage fusion. *Biol Res*. 2010;43:205-224. doi:10.4067/S0716-97602010000200009.

19. Manrique E, Luz ·, Castillo M, Lazala O, Guerrero CA, Acosta O. Bone resorptive

activity of human peripheral blood mononuclear cells after fusion with polyethylene glycol. *J Bone Miner Metab*. 2016:1-15. doi:10.1007/s00774-016-0744-0.

20. Garrett IR, Boyce BF, Oreffo ROC, Bonewald L, Poser J, Mundy GR. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J Clin Invest*. 1990;85(3):632-639. doi:10.1172/JCI114485.

21. Lerner UH. Osteoblasts, Osteoclasts, and Osteocytes: Unveiling Their Intimate-Associated Responses to Applied Orthodontic Forces. *Semin Orthod*. 2012;18(4):237-248. doi:10.1053/j.sodo.2012.06.002.

22. Van Schepdael A, Vander Sloten J, Geris L. Mechanobiological modeling can explain orthodontic tooth movement: Three case studies. *J Biomech*. 2013;46:470-477. doi:10.1016/j.jbiomech.2012.10.037.

23. Boyce BF, Yao Z, Xing L. Osteoclasts have multiple roles in bone in addition to bone resorption. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2009;19(3):171-180. doi:12b6e91c2627fc7a,03210611080ec17a [pii].

24. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003;423(May):337-342.

25. Li Y, Chen W, Liang Y, Li E, Stashenko P. Atp6i -deficient mice exhibit severe osteopetrosis due to loss of osteoclast-mediated extracellular acidification. *Nature*. 1999;23(december):447-451.

26. Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, et al. The Ligand for Osteoprotegerin (OPGL) Directly Activates Mature Osteoclasts. *J Cell Biol*. 1999;145(3):527-538.

27. Wagner EF, Karsenty G. Genetic control of skeletal development. *Differ gene Regul Fig*. 2001:527-532.

28. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin : A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density. *Cell*. 1997;89:309-319.

29. Resorption B, Oh D, Morony S, et al. A Chimeric Form of Osteoprotegerin Inhibits Hypercalcemia and Bone Resorption Induced by IL-1, TNF-, PTH, PTHrP, and 1,25(OH)2D3. *Nature*. 1999;14(9):1478-1485.

30. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*. 1997;390(November):175-178.

31. Li J, Sarosi I, Yan X, et al. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(4):1566-1571.

32. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*. 1999;397(6717):315-323. doi:10.1038/16852.

33. Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998;93(2):165-176. doi:10.1016/S0092-8674(00)81569-X.

34. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res*. 2000;15(1):2-12. doi:10.1080/14041040009362546.

35. Udagawa N, Takahashi N, Yasuda H, et al. Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology*. 2000;141(9):3478-3484. doi:10.1210/en.141.9.3478.

36. Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin: Paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(4):549-553. doi:10.1161/01.ATV.0000012303.37971.DA.

37. Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(7):3540-3545. doi:10.1073/pnas.96.7.3540.

38. Darnay BG, Haridas V, Ni J, Moore P a., Aggarwal BB. Characterization of the Intracellular Domain of Receptor Activator of NF- B (RANK): INTERACTION WITH TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR-ASSOCIATED FACTORS AND ACTIVATION OF NF- B AND c-JUN N-TERMINAL KINASE. *J Biol*

Chem. 1998;273(32):20551-20555. doi:10.1074/jbc.273.32.20551.

39. Lomaga MA, Yeh WC, Sarosi I, et al. TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev*. 1999;13(8):1015-1024. doi:10.1101/gad.13.8.1015.

40. David J-P, Sabapathy K, Hoffmann O, Idarraga MH, Wagner EF. JNK1 modulates osteoclastogenesis through both c-Jun phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *J Cell Sci*. 2002;115(Pt 22):4317-4325. doi:10.1242/jcs.00082.

41. Helming L, Gordon S. Molecular mediators of macrophage fusion. *Trends Cell Biol*. 2009;19(10):514-522. doi:10.1016/j.tcb.2009.07.005.

42. Mensah K a., Ritchlin CT, Schwarz EM. RANKL induces heterogeneous DC-STAMPlo and DC-STAMPhi osteoclast precursors of which the DC-STAMPlo precursors are the master fusogens. *J Cell Physiol*. 2010;223(November):76-83. doi:10.1002/jcp.22012.

43. Soe K, Andersen TL, Hobolt-Pedersen AS, Bjerregaard Bolette B, Larsson LI, Delaissé JM. Involvement of human endogenous retroviral syncytin-1 in human osteoclast fusion. *Bone*. 2011;48:837-846. doi:10.1016/j.bone.2010.11.011.

44. Hobolt-Pedersen AS, Delaiss?? JM, S??e K. Osteoclast fusion is based on heterogeneity between fusion partners. *Calcif Tissue Int*. 2014. doi:10.1007/s00223-014-9864-5.

45. Gong R, Peng X, Kang S, et al. Structural characterization of the fusion core in syncytin, envelope protein of human endogenous retrovirus family W. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;331(4):1193-1200. doi:10.1016/j.bbrc.2005.04.032.

46. Saginario C, Qian HY, Vignery a. Identification of an inducible surface molecule specific to fusing macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(26):12210-4. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=8618871.

47. Vignery a. Macrophage fusion: the making of osteoclasts and giant cells. *J Exp Med*. 2005;202(3):337-340. doi:10.1084/jem.20051123.

48. Chen EH, Grote E, Mohler W, Vignery A. Cell–cell fusion. *FEBS Lett*. 2007;581(11):2181-2193. doi:10.1016/j.febslet.2007.03.033.

49. Ishii M, Saeki Y. Osteoclast cell fusion: mechanisms and molecules. *Mod Rheumatol*. 2008;18(3):220-227. doi:10.1007/s10165-008-0051-2.

50. Yagi M, Miyamoto T, Sawatani Y, et al. DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. *J Exp Med*. 2005;202(3):345-351. doi:10.1084/jem.20050645.

51. Yagi M, Ninomiya K, Fujita N, et al. Induction of DC-STAMP by alternative activation and downstream signaling mechanisms. *J Bone Miner Res*. 2007;22(7):992-1001. doi:10.1359/jbmr.070401.

52. Yang M, Birnbaum MJ, MacKay C a, Mason-Savas A, Thompson B, Odgren PR. Osteoclast stimulatory transmembrane protein (OC-STAMP), a novel protein induced by RANKL that promotes osteoclast differentiation. *J Cell Physiol*. 2008;215(2):497-505. doi:10.1002/jcp.21331.

53. Miyamoto H, Suzuki T, Miyauchi Y, et al. Osteoclast stimulatory transmembrane protein and dendritic cell-specific transmembrane protein cooperatively modulate cell-cell fusion to form osteoclasts and foreign body giant cells. *J Bone Miner Res*. 2012;27(6):1289-1297. doi:10.1002/jbmr.1575.

54. D'Ambrosio D, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F. Chemokine receptors in inflammation: An overview. *J Immunol Methods*. 2003;273(1-2):3-13. doi:10.1016/S0022-1759(02)00414-3.

55. Yu X, Huang Y, Collin-Osdoby P, Osdoby P. CCR1 chemokines promote the chemotactic recruitment, RANKL development, and motility of osteoclasts and are induced by inflammatory cytokines in osteoblasts. *J Bone Miner Res*. 2004;19(12):2065-2077. doi:10.1359/JBMR.040910.

56. Kim MS, Day CJ, Morrison N a. MCP-1 is induced by receptor activator of nuclear factor-KB ligand, promotes human osteoclast fusion, and rescues granulocyte macrophage colony-stimulating factor suppression of osteoclast formation. *J Biol Chem*. 2005;280(16):16163-16169. doi:10.1074/jbc.M412713200.

57. Kim MS, Day CJ, Selinger CI, Magno CL, Stephens SRJ, Morrison N a. MCP-1-induced human osteoclast-like cells are tartrate-resistant acid phosphatase, NFATc1, and calcitonin receptor-positive but require receptor activator of NFκB ligand for bone resorption. *J Biol Chem*. 2006;281(2):1274-1285. doi:10.1074/jbc.M510156200.

58. Miyamoto K, Ninomiya K, Sonoda KH, et al. MCP-1 expressed by osteoclasts stimulates osteoclastogenesis in an autocrine/paracrine manner. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;383(3):373-377. doi:10.1016/j.bbrc.2009.04.020.

59. Hui SW, Kuhl TL, Guo YQ, Israelachvili J. Use of poly(ethylene glycol) to control cell aggregation and fusion. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 1999;14(1-4):213-222. doi:10.1016/S0927-7765(99)00037-5.

60. Lentz BR, Lee JK. Poly(ethylene glycol) (PEG)-mediated fusion between pure lipid bilayers: a mechanism in common with viral fusion and secretory vesicle release? *Mol Membr Biol*. 1999;16(4):279-296. doi:10.1080/096876899294508.

61. Basáñez G, Goñi FM, Alonso A. Poly(ethylene glycol)-lipid conjugates inhibit phospholipase C-induced lipid hydrolysis, liposome aggregation and fusion through independent mechanisms. *FEBS Lett*. 1997;411(2-3):281-286. doi:10.1016/S0014-5793(97)00716-3.

62. Lee J, Lentz BR. Evolution of lipidic structures during model membrane fusion and the relation of this process to cell membrane fusion. *Biochemistry*. 1997;36(21):6251-6259. doi:10.1021/bi970404c.

63. Lee J, Lentz BR. Secretory and viral fusion may share mechanistic events with fusion between curved lipid bilayers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(16):9274-9279. doi:10.1073/pnas.95.16.9274.

64. Evans KO, Lentz BR. Kinetics of lipid rearrangements during poly(ethylene glycol) mediated fusion of highly curved unilamellar vesicles. *Biochemistry*. 2002;41(4):1241-1249. doi:10.1021/bi011508x.

65. Wu JR, Lentz BR. Mechanism of poly(ethylene glycol)-induced lipid transfer between phosphatidylcholine large unilamellar vesicles: a fluorescent probe study.

Biochemistry. 1991;30(27):6780-6787. doi:10.1021/bi00241a022.

66. Kitaura H, Kimura K, Ishida M, Sugisawa H, Kohara H. Effect of Cytokines on Osteoclast Formation and Bone Resorption during Mechanical Force Loading of the Periodontal Membrane Effect of Cytokines on Osteoclast Formation and Bone Resorption during Mechanical Force Loading of. *Sci World J*. 2016;2014(January 2014):1-7. doi:10.1155/2014/617032.

67. Lowney JJ, Norton LA, Shafer DM, Rossomando EF. Orthodontic forces increase tumor necrosis factor ?? in the human gingival sulcus. *Am J Orthod Dentofac Orthop*. 1995;108(5):519-524. doi:10.1016/S0889-5406(95)70052-8.

68. Abu-Amer Y, Erdmann J, Alexopoulou L, Kollias G, Ross FP, Teitelbaum SL. Tumor necrosis factor receptors types 1 and 2 differentially regulate osteoclastogenesis. *J Biol Chem*. 2000;275(35):27307-27310. doi:10.1074/jbc.M003886200.

69. Nazeer Ahmed Meeran. Cellular response within the periodontal ligament on application of orthodontic forces. *J Indian Soc Periodontol*. 2013;17(1):16-20. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3636936/.

70. Mitchell JA, Larkin S, Williams TJ. Cyclooxygenase-2: Regulation and relevance in inflammation. *Biochem Pharmacol*. 1995;50(10):1535-1542. doi:10.1016/0006-2952(95)00212-X.

71. Krishnan V, Davidovitch Z. On a path to unfolding the biological mechanisms of orthodontic tooth movement. *J Dent Res*. 2009;88(7):597-608. doi:10.1177/0022034509338914.

72. Lohinai Z, Stachlewitz R, Székely AD, Fehér E, Dézsi L, Szabó C. Evidence for the expression of cyclooxygenase-2 enzyme in periodontitis. *Life Sci*. 2001;70(3):279-290. doi:10.1016/S0024-3205(01)01391-1.

73. Robert Anthony CM. Prostaglandins are necessary for osteoclast-activating factor production by activated peripheral blood leucocytes. *J Exp Med*. 2015;212(4):457-467. doi:10.1084/jem.20142182.

74. Steeve KT, Marc P, Sandrine T, Dominique H, Yannick F. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: Interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004;15(1):49-60. doi:10.1016/j.cytogfr.2003.10.005.

75. Masella RS, Meister M. Current concepts in the biology of orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofac Orthop*. 2006;8(1):6-12. doi:10.1016/j.ajodo.2005.12.013.

76. Kook S, Young-ok, Hwang J, et al. Mechanical Force Inhibits Osteoclastogenic Potential of Human Periodontal Ligament Fibroblasts Through OPG Production and ERK-Mediated Signaling. *J Cell Biochem*. 2009;1019(January 2008):1010-1019. doi:10.1002/jcb.22086.

77. Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci*. 2003:6-20. doi:10.1007/s000180300001.

78. Beckman KB, Ames BN. Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem*. 1997;272(32):19633-19636. doi:10.1074/jbc.272.32.19633.

79. Winterbourn CC, Metodiewa D. Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med*. 1999;27(3-4):322-328. doi:10.1016/S0891-5849(99)00051-9.

80. Whillier S, Raftos JE, Chapman B, Kuchel PW. Role of N-acetylcysteine and cystine in glutathione synthesis in human erythrocytes. *Redox Rep*. 2009;14(3):115-124. doi:10.1179/135100009X392539.

81. Samuni Y, Goldstein S, Dean OM, Berk M. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochim Biophys Acta*. 2013. doi:10.1016/j.bbagen.2013.04.016.

82. Protocols E. Vybrant ™ Cell-Labeling Solutions. 2011:6-8.

83. Islam R, Bae HS, Yoon WJ, et al. Pin1 regulates osteoclast fusion through suppression of the master regulator of cell fusion DC-STAMP. *J Cell Physiol*. 2014;229(12):2166-2174. doi:10.1002/jcp.24679.

84. Takahashi N, Udagawa N, Kobayashi Y, Suda T. Generation of osteoclasts in vitro,

and assay of osteoclast activity. *Methods Mol Med*. 2007;135:285-300.

85. Hall TJ, Schaeublin M, Jeker H, Fuller K, Chambers TJ. The role of reactive oxygen intermediates in osteoclastic bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;207(1):280-287. doi:10.1006/bbrc.1995.1184.

86. Moon HJ, Kim SE, Yun YP, et al. Simvastatin inhibits osteoclast differentiation by scavenging reactive oxygen species. *Exp Mol Med*. 2011;43(11):605-612. doi:10.3858/emm.2011.43.11.067.

87. Sasaki H, Yamamoto H, Tominaga K, et al. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species are essential for differentiation of a mouse macrophage cell line (RAW264 . 7) into osteoclasts. *J Med Investig*. 2009;56(6):33-41. doi:10.2152/jmi.56.33.

88. JUSSI M HALLEEN, SEIJA R RA ¨ ISA ¨ NEN, SARI L ALATALO and HKV ¨NEN. Potential Function for the ROS-Generating Activity of TRACP. *J Bone Miner Res*. 2003;18(10):1908-1911.

89. Hayman AR. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. *Autoimmunity*. 2008;41(3):218-223. doi:10.1080/08916930701694667.

90. Jung Y, Kim H, Sun HM, Sue GR, Jeong W. Dynein light chain LC8 negatively regulates NF-κB through the redox-dependent interaction with IκBα. *J Biol Chem*. 2008;283(35):23863-23871. doi:10.1074/jbc.M803072200.

91. Wittrant Y, Theoleyre S, Couillaud S, Dunstan C, Heymann D, Rédini F. Regulation of osteoclast protease expression by RANKL. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;310(3):774-778. doi:10.1016/j.bbrc.2003.09.084.

92. Ek-Rylander B, Flores M, Wendel M, Heinegard D, Andersson G. Dephosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. Modulation of osteoclast adhesion in vitro. *J Biol Chem*. 1994;269(21):14853-14856.

93. Jurdic P, Saltel F, Chabadel A, Destaing O. Podosome and sealing zone: Specificity

of the osteoclast model. *Eur J Cell Biol*. 2006;85(1):195-202. doi:10.1016/j.ejcb.2005.09.008.

94. Destaing O, Saltel F, Géminard J-C, Jurdic P, Bard F. Podosomes Display Actin Turnover and Dynamic Self- Organization in Osteoclasts Expressing Actin-Green Fluorescent Protein □ V. *Mol Biol Cell*. 2003;14:407-416. doi:10.1091/mbc.E02.

95. Takito J, Nakamura M, Yoda M, et al. The transient appearance of zipper-like actin superstructures during the fusion of osteoclasts. *J Cell Sci*. 2011;125:662-672. doi:10.1242/jcs.090886.

96. Takito J, Nakamura M. Precursors linked via the zipper-like structure or the filopodium during the secondary fusion of osteoclasts. *Commun Integr Biol*. 2012;5(5):453-457. doi:10.4161/cib.20980.

A. ANEXOS

Anexo 1. Intensidad media de fluorescencia

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
12 horas					
MEDIO vs. MEDIO + NAC	-3,169	-9,539 to 3,201	No	ns	0,7021
MEDIO vs. FUERZAS	-11,04	-17,41 to -4,673	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. FUERZAS NAC	-9,93	-16,30 to -3,560	Yes	***	0,0002
MEDIO vs. PEG	-20,75	-27,12 to -14,38	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. PEG NAC	-13,1	-19,47 to -6,732	Yes	****	< 0,0001
MEDIO + NAC vs. FUERZAS	-7,874	-14,24 to -1,504	Yes	**	0,0065
MEDIO + NAC vs. FUERZAS NAC	-6,761	-13,13 to -0,3909	Yes	*	0,0306
MEDIO + NAC vs. PEG	-17,59	-23,96 to -11,22	Yes	****	< 0,0001
MEDIO + NAC vs. PEG NAC	-9,933	-16,30 to -3,563	Yes	***	0,0002
FUERZAS vs. FUERZAS NAC	1,113	-5,257 to 7,484	No	ns	0,9959
FUERZAS vs. PEG	-9,711	-16,08 to -3,341	Yes	***	0,0003
FUERZAS vs. PEG NAC	-2,059	-8,429 to 4,311	No	ns	0,9363
FUERZAS NAC vs. PEG	-10,82	-17,19 to -4,454	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS NAC vs. PEG NAC	-3,172	-9,542 to 3,198	No	ns	0,7012
PEG vs. PEG NAC	7,652	1,282 to 14,02	Yes	**	0,009
1 DIA					
MEDIO vs. MEDIO + NAC	-1,97	-8,340 to 4,400	No	ns	0,9469
MEDIO vs. FUERZAS	-14,51	-20,88 to -8,143	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. FUERZAS NAC	-2,571	-8,941 to 3,799	No	ns	0,8507
MEDIO vs. PEG	-30,33	-36,70 to -23,96	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. PEG NAC	-9,771	-16,14 to -3,401	Yes	***	0,0003
MEDIO + NAC vs. FUERZAS	-12,54	-18,91 to -6,173	Yes	****	< 0,0001
MEDIO + NAC vs. FUERZAS NAC	-0,6011	-6,971 to 5,769	No	ns	0,9998
MEDIO + NAC vs. PEG	-28,36	-34,73 to -21,99	Yes	****	< 0,0001

MEDIO + NAC vs. PEG NAC	-7,801	-14,17 to -1,431	Yes	**	0,0072
FUERZAS vs. FUERZAS NAC	11,94	5,572 to 18,31	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS vs. PEG	-15,82	-22,19 to -9,448	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS vs. PEG NAC	4,742	-1,628 to 11,11	No	ns	0,2663
FUERZAS NAC vs. PEG	-27,76	-34,13 to -21,39	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS NAC vs. PEG NAC	-7,2	-13,57 to -0,8297	Yes	*	0,017
PEG vs. PEG NAC	20,56	14,19 to 26,93	Yes	****	< 0,0001
2 DIAS					
MEDIO vs. MEDIO + NAC	7,553	1,183 to 13,92	Yes	*	0,0104
MEDIO vs. FUERZAS	-16,8	-23,17 to -10,43	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. FUERZAS NAC	2,843	-3,527 to 9,214	No	ns	0,7885
MEDIO vs. PEG	-21,52	-27,89 to -15,15	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. PEG NAC	1,65	-4,720 to 8,020	No	ns	0,975
MEDIO + NAC vs. FUERZAS	-24,36	-30,73 to -17,99	Yes	****	< 0,0001
MEDIO + NAC vs. FUERZAS NAC	-4,71	-11,08 to 1,660	No	ns	0,2734
MEDIO + NAC vs. PEG	-29,07	-35,44 to -22,70	Yes	****	< 0,0001
MEDIO + NAC vs. PEG NAC	-5,903	-12,27 to 0,4669	No	ns	0,086
FUERZAS vs. FUERZAS NAC	19,65	13,28 to 26,02	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS vs. PEG	-4,717	-11,09 to 1,654	No	ns	0,2719
FUERZAS vs. PEG NAC	18,45	12,08 to 24,82	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS NAC vs. PEG	-24,36	-30,73 to -17,99	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS NAC vs. PEG NAC	-1,193	-7,564 to 5,177	No	ns	0,9943
PEG vs. PEG NAC	23,17	16,80 to 29,54	Yes	****	< 0,0001
4 DIAS					
MEDIO vs. MEDIO + NAC	-2,28	-8,650 to 4,090	No	ns	0,9046
MEDIO vs. FUERZAS	-24,95	-31,32 to -18,58	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. FUERZAS NAC	6,141	-0,2291 to 12,51	No	ns	0,0656
MEDIO vs. PEG	-15,44	-21,81 to -9,074	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. PEG NAC	-5,861	-12,23 to 0,5091	No	ns	0,0901
MEDIO + NAC vs. FUERZAS	-22,67	-29,04 to -16,30	Yes	****	< 0,0001
MEDIO + NAC vs. FUERZAS NAC	8,421	2,051 to 14,79	Yes	**	0,0028
MEDIO + NAC vs. PEG	-13,16	-19,53 to -6,794	Yes	****	< 0,0001
MEDIO + NAC vs. PEG NAC	-3,581	-9,951 to 2,789	No	ns	0,5817
FUERZAS vs. FUERZAS NAC	31,09	24,72 to 37,46	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS vs. PEG	9,508	3,138 to 15,88	Yes	***	0,0005
FUERZAS vs. PEG NAC	19,09	12,72 to 25,46	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS NAC vs. PEG	-21,59	-27,96 to -15,22	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS NAC vs. PEG NAC	-12	-18,37 to -5,632	Yes	****	< 0,0001
PEG vs. PEG NAC	9,583	3,213 to 15,95	Yes	***	0,0004

Anexo 1, Resumen del tratamiento estadístico por ANOVA de doble vía, prueba múltiple de comparación de Tukey para los resultados de la figura 1. Los experimentos fueron realizados por duplicado y el procedimiento se realizó dos veces de manera independiente.

Anexo 2, Porcentaje de Fusión

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
1 DIA					
MEDIO vs. MEDIO + NAC	0,25	-9,973 to 10,47	No	ns	> 0,9999
MEDIO vs. FUERZAS	-7,5	-17,72 to 2,723	No	ns	0,2536
MEDIO vs. FUERZAS NAC	-4	-14,22 to 6,223	No	ns	0,838
MEDIO vs. PEG	-39	-49,22 to -28,78	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. PEG NAC	-23,25	-33,47 to -13,03	Yes	****	< 0,0001
MEDIO + NAC vs. FUERZAS	-7,75	-17,97 to 2,473	No	ns	0,2231
MEDIO + NAC vs. FUERZAS NAC	-4,25	-14,47 to 5,973	No	ns	0,8013
MEDIO + NAC vs. PEG	-39,25	-49,47 to -29,03	Yes	****	< 0,0001
MEDIO + NAC vs. PEG NAC	-23,5	-33,72 to -13,28	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS vs. FUERZAS NAC	3,5	-6,723 to 13,72	No	ns	0,9
FUERZAS vs. PEG	-31,5	-41,72 to -21,28	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS vs. PEG NAC	-15,75	-25,97 to -5,527	Yes	***	0,0007
FUERZAS NAC vs. PEG	-35	-45,22 to -24,78	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS NAC vs. PEG NAC	-19,25	-29,47 to -9,027	Yes	****	< 0,0001
PEG vs. PEG NAC	15,75	5,527 to 25,97	Yes	***	0,0007
2 DIAS					
MEDIO vs. MEDIO + NAC	1,75	-8,473 to 11,97	No	ns	0,9949
MEDIO vs. FUERZAS	-12	-22,22 to -1,777	Yes	*	0,0141
MEDIO vs. FUERZAS NAC	-10	-20,22 to 0,2226	No	ns	0,058
MEDIO vs. PEG	-47,25	-57,47 to -37,03	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. PEG NAC	-43	-53,22 to -32,78	Yes	****	< 0,0001
MEDIO + NAC vs. FUERZAS	-13,75	-23,97 to -3,527	Yes	**	0,0037
MEDIO + NAC vs. FUERZAS NAC	-11,75	-21,97 to -1,527	Yes	*	0,017
MEDIO + NAC vs. PEG	-49	-59,22 to -38,78	Yes	****	< 0,0001
MEDIO + NAC vs. PEG NAC	-44,75	-54,97 to -34,53	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS vs. FUERZAS NAC	2	-8,223 to 12,22	No	ns	0,9906
FUERZAS vs. PEG	-35,25	-45,47 to -25,03	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS vs. PEG NAC	-31	-41,22 to -20,78	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS NAC vs. PEG	-37,25	-47,47 to -27,03	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS NAC vs. PEG NAC	-33	-43,22 to -22,78	Yes	****	< 0,0001

PEG vs. PEG NAC	4,25	-5,973 to 14,47	No	ns	0,8013
4 DIAS					
MEDIO vs. MEDIO + NAC	1	-9,223 to 11,22	No	ns	0,9997
MEDIO vs. FUERZAS	-41,5	-51,72 to -31,28	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. FUERZAS NAC	-41	-51,22 to -30,78	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. PEG	-62,25	-72,47 to -52,03	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. PEG NAC	-47,5	-57,72 to -37,28	Yes	****	< 0,0001
MEDIO + NAC vs. FUERZAS	-42,5	-52,72 to -32,28	Yes	****	< 0,0001
MEDIO + NAC vs. FUERZAS NAC	-42	-52,22 to -31,78	Yes	****	< 0,0001
MEDIO + NAC vs. PEG	-63,25	-73,47 to -53,03	Yes	****	< 0,0001
MEDIO + NAC vs. PEG NAC	-48,5	-58,72 to -38,28	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS vs. FUERZAS NAC	0,5	-9,723 to 10,72	No	ns	> 0,9999
FUERZAS vs. PEG	-20,75	-30,97 to -10,53	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS vs. PEG NAC	-6	-16,22 to 4,223	No	ns	0,4898
FUERZAS NAC vs. PEG	-21,25	-31,47 to -11,03	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS NAC vs. PEG NAC	-6,5	-16,72 to 3,723	No	ns	0,4023
PEG vs. PEG NAC	14,75	4,527 to 24,97	Yes	**	0,0017

Anexo 2, Resumen del tratamiento estadístico por ANOVA de doble vía, prueba múltiple de comparación de Tukey para los resultados de la figura 2. Los experimentos fueron realizados por duplicado y el procedimiento se realizó dos veces de manera independiente.

Anexo 3. Número de células positivas TRAP por $m.m^2$

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
2 DIAS					
MEDIO vs. MEDIO NAC	2,75	-19,16 to 24,66	No	ns	0,9982
MEDIO vs. FUERZAS	-69,75	-91,66 to -47,84	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. FUERZAS NAC	-3	-24,91 to 18,91	No	ns	0,9973
MEDIO vs. PEG	-85	-106,9 to -63,09	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. PEG NAC	-18	-39,91 to 3,911	No	ns	0,1401
MEDIO NAC vs. FUERZAS	-72,5	-94,41 to -50,59	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. FUERZAS NAC	-5,75	-27,66 to 16,16	No	ns	0,9521
MEDIO NAC vs. PEG	-87,75	-109,7 to -65,84	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. PEG NAC	-20,75	-42,66 to 1,161	No	ns	0,0685
FUERZAS vs. FUERZAS NAC	66,75	44,84 to 88,66	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS vs. PEG	-15,25	-37,16 to 6,661	No	ns	0,268
FUERZAS vs. PEG NAC	51,75	29,84 to 73,66	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS NAC vs. PEG	-82	-103,9 to -60,09	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS NAC vs. PEG NAC	-15	-36,91 to 6,911	No	ns	0,2831
PEG vs. PEG NAC	67	45,09 to 88,91	Yes	****	< 0,0001
4 DIAS					
MEDIO vs. MEDIO NAC	-2	-23,91 to 19,91	No	ns	0,9996
MEDIO vs. FUERZAS	-91	-112,9 to -69,09	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. FUERZAS NAC	-0,5	-22,41 to 21,41	No	ns	> 0,9999
MEDIO vs. PEG	-132,5	-154,4 to -110,6	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. PEG NAC	-6,5	-28,41 to 15,41	No	ns	0,9225
MEDIO NAC vs. FUERZAS	-89	-110,9 to -67,09	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. FUERZAS NAC	1,5	-20,41 to 23,41	No	ns	> 0,9999
MEDIO NAC vs. PEG	-130,5	-152,4 to -108,6	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. PEG NAC	-4,5	-26,41 to 17,41	No	ns	0,983
FUERZAS vs. FUERZAS NAC	90,5	68,59 to 112,4	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS vs. PEG	-41,5	-63,41 to -19,59	Yes	***	0,0002
FUERZAS vs. PEG NAC	84,5	62,59 to 106,4	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS NAC vs. PEG	-132	-153,9 to -110,1	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS NAC vs. PEG NAC	-6	-27,91 to 15,91	No	ns	0,9432
PEG vs. PEG NAC	126	104,1 to 147,9	Yes	****	< 0,0001

Anexo 3, Resumen del tratamiento estadístico por ANOVA de doble vía, prueba múltiple de comparación de Tukey para los resultados de la figura 3. Los experimentos fueron realizados por duplicado y el procedimiento se realizó dos veces de manera independiente.

Anexo 4. Número de células multinucleadas TRAP por m.m^2

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
2 DIAS					
MEDIO vs. MEDIO NAC	1,575	-1,579 to 4,729	No	ns	0,5975
MEDIO vs. FUERZAS	-10,88	-14,03 to -7,721	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. FUERZAS NAC	-2,125	-5,279 to 1,029	No	ns	0,2979
MEDIO vs. PEG	-25,83	-28,98 to -22,67	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. PEG NAC	-4,275	-7,429 to -1,121	Yes	**	0,0056
MEDIO NAC vs. FUERZAS	-12,45	-15,60 to -9,296	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. FUERZAS NAC	-3,7	-6,854 to -0,5459	Yes	*	0,0173
MEDIO NAC vs. PEG	-27,4	-30,55 to -24,25	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. PEG NAC	-5,85	-9,004 to -2,696	Yes	***	0,0003
FUERZAS vs. FUERZAS NAC	8,75	5,596 to 11,90	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS vs. PEG	-14,95	-18,10 to -11,80	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS vs. PEG NAC	6,6	3,446 to 9,754	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS NAC vs. PEG	-23,7	-26,85 to -20,55	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS NAC vs. PEG NAC	-2,15	-5,304 to 1,004	No	ns	0,287
PEG vs. PEG NAC	21,55	18,40 to 24,70	Yes	****	< 0,0001
4 DIAS					
MEDIO vs. MEDIO NAC	-2,325	-5,479 to 0,8291	No	ns	0,2187
MEDIO vs. FUERZAS	-15,13	-18,28 to -11,97	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. FUERZAS NAC	-5,7	-8,854 to -2,546	Yes	***	0,0004
MEDIO vs. PEG	-29,08	-32,23 to -25,92	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. PEG NAC	-6,425	-9,579 to -3,271	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. FUERZAS	-12,8	-15,95 to -9,646	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. FUERZAS NAC	-3,375	-6,529 to -0,2209	Yes	*	0,0327
MEDIO NAC vs. PEG	-26,75	-29,90 to -23,60	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. PEG NAC	-4,1	-7,254 to -0,9459	Yes	**	0,0079
FUERZAS vs. FUERZAS NAC	9,425	6,271 to 12,58	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS vs. PEG	-13,95	-17,10 to -10,80	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS vs. PEG NAC	8,7	5,546 to 11,85	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS NAC vs. PEG	-23,38	-26,53 to -20,22	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS NAC vs. PEG NAC	-0,725	-3,879 to 2,429	No	ns	0,9724
PEG vs. PEG NAC	22,65	19,50 to 25,80	Yes	****	< 0,0001

Anexo 4, Resumen del tratamiento estadístico por ANOVA de doble vía, prueba múltiple de comparación de Tukey para los resultados de la figura 3. Los experimentos fueron realizados por duplicado y el procedimiento se realizó dos veces de manera independiente.

Anexo 5. Porcentaje de resorción

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
MEDIO vs. MEDIO + NAC	1,023	-10,40 to 12,45	No	ns	0,9563
MEDIO vs. FUERZAS	-27,89	-50,60 to -5,176	Yes	*	0,0336
MEDIO vs. FUERZAS+NAC	1,023	-10,40 to 12,45	No	ns	0,9563
MEDIO vs. PEG	-27,89	-50,60 to -5,176	Yes	*	0,0336
MEDIO vs. PEG NAC	-4,69	-10,02 to 0,6416	No	ns	0,0639
MEDIO + NAC vs. FUERZAS	-28,91	-42,04 to -15,79	Yes	*	0,0112
MEDIO + NAC vs. FUERZAS+NAC					
MEDIO + NAC vs. PEG	-28,91	-42,04 to -15,79	Yes	*	0,0112
MEDIO + NAC vs. PEG NAC	-5,713	-14,59 to 3,160	No	ns	0,1147
FUERZAS vs. FUERZAS+NAC	28,91	15,79 to 42,04	Yes	*	0,0112
FUERZAS vs. PEG					
FUERZAS vs. PEG NAC	23,2	1,456 to 44,94	Yes	*	0,0441
FUERZAS+NAC vs. PEG	-28,91	-42,04 to -15,79	Yes	*	0,0112
FUERZAS+NAC vs. PEG NAC	-5,713	-14,59 to 3,160	No	ns	0,1147
PEG vs. PEG NAC	23,2	1,456 to 44,94	Yes	*	0,0441

Resumen del tratamiento estadístico por ANOVA de una vía, prueba múltiple de comparación de Tukey para los resultados de la figura 4. Los experimentos fueron realizados por duplicado y el procedimiento se realizó dos veces de manera independiente

Anexo 6, Número de células positivas ADAM 12

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
2 DIAS					
MEDIO vs. MEDIO NAC	-0,5	-7,330 to 6,330	No	ns	0,9999
MEDIO vs. FUERZAS	-19,75	-26,58 to -12,92	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. FUERZAS NAC	-22,5	-29,33 to -15,67	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. PEG	-23,75	-30,58 to -16,92	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. PEG NAC	-22,25	-29,08 to -15,42	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. FUERZAS	-19,25	-26,08 to -12,42	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. FUERZAS NAC	-22	-28,83 to -15,17	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. PEG	-23,25	-30,08 to -16,42	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. PEG NAC	-21,75	-28,58 to -14,92	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS vs. FUERZAS NAC	-2,75	-9,580 to 4,080	No	ns	0,7765
FUERZAS vs. PEG	-4	-10,83 to 2,830	No	ns	0,4371
FUERZAS vs. PEG NAC	-2,5	-9,330 to 4,330	No	ns	0,8352
FUERZAS NAC vs. PEG	-1,25	-8,080 to 5,580	No	ns	0,9898
FUERZAS NAC vs. PEG NAC	0,25	-6,580 to 7,080	No	ns	> 0,9999
PEG vs. PEG NAC	1,5	-5,330 to 8,330	No	ns	0,9773
4 DIAS					
MEDIO vs. MEDIO NAC	0	-6,830 to 6,830	No	ns	> 0,9999
MEDIO vs. FUERZAS	-26,25	-33,08 to -19,42	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. FUERZAS NAC	-22,5	-29,33 to -15,67	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. PEG	-24	-30,83 to -17,17	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. PEG NAC	0	-6,830 to 6,830	No	ns	> 0,9999
MEDIO NAC vs. FUERZAS	-26,25	-33,08 to -19,42	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. FUERZAS NAC	-22,5	-29,33 to -15,67	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. PEG	-24	-30,83 to -17,17	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. PEG NAC	0	-6,830 to 6,830	No	ns	> 0,9999
FUERZAS vs. FUERZAS NAC	3,75	-3,080 to 10,58	No	ns	0,5033
FUERZAS vs. PEG	2,25	-4,580 to 9,080	No	ns	0,8856
FUERZAS vs. PEG NAC	26,25	19,42 to 33,08	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS NAC vs. PEG	-1,5	-8,330 to 5,330	No	ns	0,9773
FUERZAS NAC vs. PEG NAC	22,5	15,67 to 29,33	Yes	****	< 0,0001

PEG vs. PEG NAC	24	17,17 to 30,83	Yes	****	< 0,0001

Anexo 6, Resumen del tratamiento estadístico por ANOVA de doble vía, prueba múltiple de comparación de Tukey para los resultados de la figura 13. Los experimentos fueron realizados por duplicado y el procedimiento se realizó dos veces de manera independiente

Anexo 7 números de células positivas para anhidrasa carbónica

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
2 dias					
MEDIO vs. MEDIO NAC	0	-13,12 to 13,12	No	ns	> 0,9999
MEDIO vs. FUERZA	-3,75	-16,87 to 9,366	No	ns	0,9327
MEDIO vs. FUERZAS NAC	-22,5	-35,62 to -9,384	Yes	***	0,0006
MEDIO vs. PEG	-41	-54,12 to -27,88	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. PEG NAC	-35	-48,12 to -21,88	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. FUERZA	-3,75	-16,87 to 9,366	No	ns	0,9327
MEDIO NAC vs. FUERZAS NAC	-22,5	-35,62 to -9,384	Yes	***	0,0006
MEDIO NAC vs. PEG	-41	-54,12 to -27,88	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. PEG NAC	-35	-48,12 to -21,88	Yes	****	< 0,0001
FUERZA vs. FUERZAS NAC	-18,75	-31,87 to -5,634	Yes	**	0,0035
FUERZA vs. PEG	-37,25	-50,37 to -24,13	Yes	****	< 0,0001
FUERZA vs. PEG NAC	-31,25	-44,37 to -18,13	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS NAC vs. PEG	-18,5	-31,62 to -5,384	Yes	**	0,004
FUERZAS NAC vs. PEG NAC	-12,5	-25,62 to 0,6160	No	ns	0,0661
PEG vs. PEG NAC	6	-7,116 to 19,12	No	ns	0,6774
4 dias					
MEDIO vs. MEDIO NAC	0	-13,12 to 13,12	No	ns	> 0,9999
MEDIO vs. FUERZA	-27,75	-40,87 to -14,63	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. FUERZAS NAC	-22	-35,12 to -8,884	Yes	***	0,0008
MEDIO vs. PEG	-44,5	-57,62 to -31,38	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. PEG NAC	-37,5	-50,62 to -24,38	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. FUERZA	-27,75	-40,87 to -14,63	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. FUERZAS NAC	-22	-35,12 to -8,884	Yes	***	0,0008
MEDIO NAC vs. PEG	-44,5	-57,62 to -31,38	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. PEG NAC	-37,5	-50,62 to -24,38	Yes	****	< 0,0001
FUERZA vs. FUERZAS NAC	5,75	-7,366 to 18,87	No	ns	0,7129
FUERZA vs. PEG	-16,75	-29,87 to -3,634	Yes	**	0,0091
FUERZA vs. PEG NAC	-9,75	-22,87 to 3,366	No	ns	0,2119

FUERZAS NAC vs. PEG	-22,5	-35,62 to -9,384	Yes	***	0,0006
FUERZAS NAC vs. PEG NAC	-15,5	-28,62 to -2,384	Yes	*	0,0164
PEG vs. PEG NAC	7	-6,116 to 20,12	No	ns	0,532

Anexo 7, Resumen del tratamiento estadístico por ANOVA de doble vía, prueba múltiple de comparación de Tukey para los resultados de la figura 6. Los experimentos fueron realizados por duplicado y el procedimiento se realizó dos veces de manera independiente

Anexo 8, número de células positivas para Catepsina K.

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
2 DIAS					
MEDIO vs. MEDIO NAC	0,5	-8,179 to 9,179	No	ns	> 0,9999
MEDIO vs. FUERZAS	-23	-31,68 to -14,32	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. FUERZAS NAC	-24,5	-33,18 to -15,82	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. PEG	-26,5	-35,18 to -17,82	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. PEG NAC	-25,5	-34,18 to -16,82	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. FUERZAS	-23,5	-32,18 to -14,82	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. FUERZAS NAC	-25	-33,68 to -16,32	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. PEG	-27	-35,68 to -18,32	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. PEG NAC	-26	-34,68 to -17,32	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS vs. FUERZAS NAC	-1,5	-10,18 to 7,179	No	ns	0,9922
FUERZAS vs. PEG	-3,5	-12,18 to 5,179	No	ns	0,7753
FUERZAS vs. PEG NAC	-2,5	-11,18 to 6,179	No	ns	0,9307
FUERZAS NAC vs. PEG	-2	-10,68 to 6,679	No	ns	0,9721
FUERZAS NAC vs. PEG NAC	-1	-9,679 to 7,679	No	ns	0,9988
PEG vs. PEG NAC	1	-7,679 to 9,679	No	ns	0,9988
4 DIAS					
MEDIO vs. MEDIO NAC	1	-7,679 to 9,679	No	ns	0,9988
MEDIO vs. FUERZAS	-29,75	-38,43 to -21,07	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. FUERZAS NAC	-23,75	-32,43 to -15,07	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. PEG	0,5	-8,179 to 9,179	No	ns	> 0,9999
MEDIO vs. PEG NAC	0,25	-8,429 to 8,929	No	ns	> 0,9999
MEDIO NAC vs. FUERZAS	-30,75	-39,43 to -22,07	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. FUERZAS NAC	-24,75	-33,43 to -16,07	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. PEG	-0,5	-9,179 to 8,179	No	ns	> 0,9999
MEDIO NAC vs. PEG NAC	-0,75	-9,429 to 7,929	No	ns	0,9997
FUERZAS vs. FUERZAS NAC	6	-2,679 to 14,68	No	ns	0,2741
FUERZAS vs. PEG	30,25	21,57 to 38,93	Yes	****	< 0,0001

FUERZAS vs. PEG NAC	30	21,32 to 38,68	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS NAC vs. PEG	24,25	15,57 to 32,93	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS NAC vs. PEG NAC	24	15,32 to 32,68	Yes	****	< 0,0001
PEG vs. PEG NAC	-0,25	-8,929 to 8,429	No	ns	> 0,9999

Anexo 8, Resumen del tratamiento estadístico por ANOVA de doble vía, prueba múltiple de comparación de Tukey para los resultados de la figura 11. Los experimentos fueron realizados por duplicado y el procedimiento se realizó dos veces de manera independiente

Anexo 9, número de células positivas para DC-STAMP

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
2 DIAS					
MEDIO vs. MEDIO NAC	-0,25	-8,350 to 7,850	No	ns	> 0,9999
MEDIO vs. FUERZAS	-26,25	-34,35 to -18,15	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. FUERZAS NAC	-21	-29,10 to -12,90	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. PEG	-37,5	-45,60 to -29,40	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. PEG NAC	-20,5	-28,60 to -12,40	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. FUERZAS	-26	-34,10 to -17,90	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. FUERZAS NAC	-20,75	-28,85 to -12,65	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. PEG	-37,25	-45,35 to -29,15	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. PEG NAC	-20,25	-28,35 to -12,15	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS vs. FUERZAS NAC	5,25	-2,850 to 13,35	No	ns	0,335
FUERZAS vs. PEG	-11,25	-19,35 to -3,150	Yes	**	0,0045
FUERZAS vs. PEG NAC	5,75	-2,350 to 13,85	No	ns	0,2505
FUERZAS NAC vs. PEG	-16,5	-24,60 to -8,400	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS NAC vs. PEG NAC	0,5	-7,600 to 8,600	No	ns	> 0,9999
PEG vs. PEG NAC	17	8,900 to 25,10	Yes	****	< 0,0001
4 DIAS					
MEDIO vs. MEDIO NAC	-1,25	-9,350 to 6,850	No	ns	0,9953
MEDIO vs. FUERZAS	-40,75	-48,85 to -32,65	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. FUERZAS NAC	-26,75	-34,85 to -18,65	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. PEG	-43	-51,10 to -34,90	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. PEG NAC	-26	-34,10 to -17,90	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. FUERZAS	-39,5	-47,60 to -31,40	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. FUERZAS NAC	-25,5	-33,60 to -17,40	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. PEG	-41,75	-49,85 to -33,65	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. PEG NAC	-24,75	-32,85 to -16,65	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS vs. FUERZAS NAC	14	5,900 to 22,10	Yes	***	0,0006

FUERZAS vs. PEG	-2,25	-10,35 to 5,850	No	ns	0,9399
FUERZAS vs. PEG NAC	14,75	6,650 to 22,85	Yes	***	0,0003
FUERZAS NAC vs. PEG	-16,25	-24,35 to -8,150	Yes	***	0,0001
FUERZAS NAC vs. PEG NAC	0,75	-7,350 to 8,850	No	ns	0,9996
PEG vs. PEG NAC	17	8,900 to 25,10	Yes	****	< 0,0001

Anexo 9, Resumen del tratamiento estadístico por ANOVA de doble vía, prueba múltiple de comparación de Tukey para los resultados de la figura 7. Los experimentos fueron realizados por duplicado y el procedimiento se realizó dos veces de manera independiente

Anexo 10 Número de células positivas a integrina-β3

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
2 DIAS					
MEDIO vs. MEDIO NAC	19,75	14,76 to 24,74	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. FUERZAS	-6	-10,99 to -1,014	Yes	*	0,0144
MEDIO vs. FUERZAS NAC	-4,75	-9,736 to 0,2365	No	ns	0,0663
MEDIO vs. PEG	-2,75	-7,736 to 2,236	No	ns	0,4987
MEDIO vs. PEG NAC	-1	-5,986 to 3,986	No	ns	0,9847
MEDIO NAC vs. FUERZAS	-25,75	-30,74 to -20,76	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. FUERZAS NAC	-24,5	-29,49 to -19,51	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. PEG	-22,5	-27,49 to -17,51	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. PEG NAC	-20,75	-25,74 to -15,76	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS vs. FUERZAS NAC	1,25	-3,736 to 6,236	No	ns	0,9603
FUERZAS vs. PEG	3,25	-1,736 to 8,236	No	ns	0,3296
FUERZAS vs. PEG NAC	5	0,01354 to 9,986	Yes	*	0,0492
FUERZAS NAC vs. PEG	2	-2,986 to 6,986	No	ns	0,7791
FUERZAS NAC vs. PEG NAC	3,75	-1,236 to 8,736	No	ns	0,2027
PEG vs. PEG NAC	1,75	-3,236 to 6,736	No	ns	0,8571
4 DIAS					
MEDIO vs. MEDIO NAC	-19	-23,99 to -14,01	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. FUERZAS	-26,25	-31,24 to -21,26	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. FUERZAS NAC	-20,75	-25,74 to -15,76	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. PEG	-29	-33,99 to -24,01	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. PEG NAC	-22,75	-27,74 to -17,76	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. FUERZAS	-7,25	-12,24 to -2,264	Yes	**	0,003
MEDIO NAC vs. FUERZAS NAC	-1,75	-6,736 to 3,236	No	ns	0,8571
MEDIO NAC vs. PEG	-10	-14,99 to -5,014	Yes	***	0,0001
MEDIO NAC vs. PEG NAC	-3,75	-8,736 to 1,236	No	ns	0,2027
FUERZAS vs. FUERZAS NAC	5,5	0,5135 to 10,49	Yes	*	0,0267
FUERZAS vs. PEG	-2,75	-7,736 to 2,236	No	ns	0,4987

FUERZAS vs. PEG NAC	3,5	-1,486 to 8,486	No	ns	0,2604
FUERZAS NAC vs. PEG	-8,25	-13,24 to -3,264	Yes	***	0,0009
FUERZAS NAC vs. PEG NAC	-2	-6,986 to 2,986	No	ns	0,7791
PEG vs. PEG NAC	6,25	1,264 to 11,24	Yes	*	0,0105

Anexo 10, Resumen del tratamiento estadístico por ANOVA de doble vía, prueba múltiple de comparación de Tukey para los resultados de la figura 9. Los experimentos fueron realizados por duplicado y el procedimiento se realizó dos veces de manera independiente

Anexo 11, número de células positivas metaloproteinasa 9

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
2 DIAS					
MEDIO vs. MEDIO NAC	0	-7,610 to 7,610	No	ns	> 0,9999
MEDIO vs. FUERZAS	-26,75	-34,36 to -19,14	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. FUERZAS NAC	0,25	-7,360 to 7,860	No	ns	> 0,9999
MEDIO vs. PEG	0,25	-7,360 to 7,860	No	ns	> 0,9999
MEDIO vs. PEG NAC	0,25	-7,360 to 7,860	No	ns	> 0,9999
MEDIO NAC vs. FUERZAS	-26,75	-34,36 to -19,14	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. FUERZAS NAC	0,25	-7,360 to 7,860	No	ns	> 0,9999
MEDIO NAC vs. PEG	0,25	-7,360 to 7,860	No	ns	> 0,9999
MEDIO NAC vs. PEG NAC	0,25	-7,360 to 7,860	No	ns	> 0,9999
FUERZAS vs. FUERZAS NAC	27	19,39 to 34,61	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS vs. PEG	27	19,39 to 34,61	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS vs. PEG NAC	27	19,39 to 34,61	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS NAC vs. PEG	0	-7,610 to 7,610	No	ns	> 0,9999
FUERZAS NAC vs. PEG NAC	0	-7,610 to 7,610	No	ns	> 0,9999
PEG vs. PEG NAC	0	-7,610 to 7,610	No	ns	> 0,9999
4 DIAS					
MEDIO vs. MEDIO NAC	0,25	-7,360 to 7,860	No	ns	> 0,9999
MEDIO vs. FUERZAS	-22,75	-30,36 to -15,14	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. FUERZAS NAC	-20,75	-28,36 to -13,14	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. PEG	-28,75	-36,36 to -21,14	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. PEG NAC	-22	-29,61 to -14,39	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. FUERZAS	-23	-30,61 to -15,39	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. FUERZAS NAC	-21	-28,61 to -13,39	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. PEG	-29	-36,61 to -21,39	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. PEG NAC	-22,25	-29,86 to -14,64	Yes	****	< 0,0001

FUERZAS vs. FUERZAS NAC	2	-5,610 to 9,610	No	ns	0,9519
FUERZAS vs. PEG	-6	-13,61 to 1,610	No	ns	0,1675
FUERZAS vs. PEG NAC	0,75	-6,860 to 8,360	No	ns	0,9994
FUERZAS NAC vs. PEG	-8	-15,61 to -0,3901	Yes	*	0,0367
FUERZAS NAC vs. PEG NAC	-1,25	-8,860 to 6,360	No	ns	0,9938
PEG vs. PEG NAC	6,75	-0,8599 to 14,36	No	ns	0,0971

Anexo 11, Resumen del tratamiento estadístico por ANOVA de doble vía, prueba múltiple de comparación de Tukey para los resultados de la figura 10. Los experimentos fueron realizados por duplicado y el procedimiento se realizó dos veces de manera independiente

Anexo 12, número de células positivas VATP,

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
2 DIAS					
MEDIO vs. MEDIO NAC	-0,25	-8,998 to 8,498	No	ns	> 0,9999
MEDIO vs. FUERZAS	-12,75	-21,50 to -4,002	Yes	**	0,003
MEDIO vs. FUERZAS NAC	-27,25	-36,00 to -18,50	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. PEG	-27,5	-36,25 to -18,75	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. PEG NAC	-21	-29,75 to -12,25	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. FUERZAS	-12,5	-21,25 to -3,752	Yes	**	0,0035
MEDIO NAC vs. FUERZAS NAC	-27	-35,75 to -18,25	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. PEG	-27,25	-36,00 to -18,50	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. PEG NAC	-20,75	-29,50 to -12,00	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS vs. FUERZAS NAC	-14,5	-23,25 to -5,752	Yes	***	0,0009
FUERZAS vs. PEG	-14,75	-23,50 to -6,002	Yes	***	0,0007
FUERZAS vs. PEG NAC	-8,25	-17,00 to 0,4977	No	ns	0,0701
FUERZAS NAC vs. PEG	-0,25	-8,998 to 8,498	No	ns	> 0,9999
FUERZAS NAC vs. PEG NAC	6,25	-2,498 to 15,00	No	ns	0,2449
PEG vs. PEG NAC	6,5	-2,248 to 15,25	No	ns	0,2122
4 DIAS					
MEDIO vs. MEDIO NAC	0,25	-8,498 to 8,998	No	ns	> 0,9999
MEDIO vs. FUERZAS	-29,75	-38,50 to -21,00	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. FUERZAS NAC	-28,75	-37,50 to -20,00	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. PEG	-28	-36,75 to -19,25	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. PEG NAC	-23,25	-32,00 to -14,50	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. FUERZAS	-30	-38,75 to -21,25	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. FUERZAS NAC	-29	-37,75 to -20,25	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. PEG	-28,25	-37,00 to -19,50	Yes	****	< 0,0001

MEDIO NAC vs. PEG NAC	-23,5	-32,25 to -14,75	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS vs. FUERZAS NAC	1	-7,748 to 9,748	No	ns	0,9989
FUERZAS vs. PEG	1,75	-6,998 to 10,50	No	ns	0,9849
FUERZAS vs. PEG NAC	6,5	-2,248 to 15,25	No	ns	0,2122
FUERZAS NAC vs. PEG	0,75	-7,998 to 9,498	No	ns	0,9997
FUERZAS NAC vs. PEG NAC	5,5	-3,248 to 14,25	No	ns	0,365
PEG vs. PEG NAC	4,75	-3,998 to 13,50	No	ns	0,5145

Anexo 12, Resumen del tratamiento estadístico por ANOVA de doble vía, prueba múltiple de comparación de Tukey para los resultados de la figura 13. Los experimentos fueron realizados por duplicado y el procedimiento se realizó dos veces de manera independiente

Anexo 13, número de células positivas Receptor de calcitonina

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
2 DIAS					
MEDIO vs. MEDIO NAC	-14,75	-23,12 to -6,377	Yes	***	0,0005
MEDIO vs. FUERZAS	-30,75	-39,12 to -22,38	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. FUERZAS NAC	-21	-29,37 to -12,63	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. PEG	-37,75	-46,12 to -29,38	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. PEG NAC	-20,25	-28,62 to -11,88	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. FUERZAS	-16	-24,37 to -7,627	Yes	***	0,0002
MEDIO NAC vs. FUERZAS NAC	-6,25	-14,62 to 2,123	No	ns	0,2086
MEDIO NAC vs. PEG	-23	-31,37 to -14,63	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. PEG NAC	-5,5	-13,87 to 2,873	No	ns	0,322
FUERZAS vs. FUERZAS NAC	9,75	1,377 to 18,12	Yes	*	0,0183
FUERZAS vs. PEG	-7	-15,37 to 1,373	No	ns	0,1293
FUERZAS vs. PEG NAC	10,5	2,127 to 18,87	Yes	*	0,0105
FUERZAS NAC vs. PEG	-16,75	-25,12 to -8,377	Yes	***	0,0001
FUERZAS NAC vs. PEG NAC	0,75	-7,623 to 9,123	No	ns	0,9997
PEG vs. PEG NAC	17,5	9,127 to 25,87	Yes	****	< 0,0001
4 DIAS					
MEDIO vs. MEDIO NAC	-0,75	-9,123 to 7,623	No	ns	0,9997
MEDIO vs. FUERZAS	-34,5	-42,87 to -26,13	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. FUERZAS NAC	-23	-31,37 to -14,63	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. PEG	-36,75	-45,12 to -28,38	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. PEG NAC	-22,5	-30,87 to -14,13	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. FUERZAS	-33,75	-42,12 to -25,38	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. FUERZAS NAC	-22,25	-30,62 to -13,88	Yes	****	< 0,0001

MEDIO NAC vs. PEG	-36	-44,37 to -27,63	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. PEG NAC	-21,75	-30,12 to -13,38	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS vs. FUERZAS NAC	11,5	3,127 to 19,87	Yes	**	0,005
FUERZAS vs. PEG	-2,25	-10,62 to 6,123	No	ns	0,9473
FUERZAS vs. PEG NAC	12	3,627 to 20,37	Yes	**	0,0034
FUERZAS NAC vs. PEG	-13,75	-22,12 to -5,377	Yes	***	0,001
FUERZAS NAC vs. PEG NAC	0,5	-7,873 to 8,873	No	ns	> 0,9999
PEG vs. PEG NAC	14,25	5,877 to 22,62	Yes	***	0,0007

Anexo 13, Resumen del tratamiento estadístico por ANOVA de doble vía, prueba múltiple de comparación de Tukey para los resultados de la figura 8. Los experimentos fueron realizados por duplicado y el procedimiento se realizó dos veces de manera independiente

Anexo 14. Numero de células positivas NFKβ-p

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
2 DIAS					
MEDIO vs. MEDIO NAC	-3,25	-15,48 to 8,982	No	ns	0,9497
MEDIO vs. FUERZAS	-37,5	-49,73 to -25,27	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. FUERZAS NAC	-24	-36,23 to -11,77	Yes	***	0,0002
MEDIO vs. PEG	-41,75	-53,98 to -29,52	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. PEG NAC	-3,25	-15,48 to 8,982	No	ns	0,9497
MEDIO NAC vs. FUERZAS	-34,25	-46,48 to -22,02	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. FUERZAS NAC	-20,75	-32,98 to -8,518	Yes	***	0,0007
MEDIO NAC vs. PEG	-38,5	-50,73 to -26,27	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. PEG NAC	0	-12,23 to 12,23	No	ns	> 0,9999
FUERZAS vs. FUERZAS NAC	13,5	1,268 to 25,73	Yes	*	0,0266
FUERZAS vs. PEG	-4,25	-16,48 to 7,982	No	ns	0,862
FUERZAS vs. PEG NAC	34,25	22,02 to 46,48	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS NAC vs. PEG	-17,75	-29,98 to -5,518	Yes	**	0,0031
FUERZAS NAC vs. PEG NAC	20,75	8,518 to 32,98	Yes	***	0,0007
PEG vs. PEG NAC	38,5	26,27 to 50,73	Yes	****	< 0,0001
4 DIAS					
MEDIO vs. MEDIO NAC	-3,25	-15,48 to 8,982	No	ns	0,9497
MEDIO vs. FUERZAS	-31,75	-43,98 to -19,52	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. FUERZAS NAC	-10,25	-22,48 to 1,982	No	ns	0,128
MEDIO vs. PEG	-40	-52,23 to -27,77	Yes	****	< 0,0001
MEDIO vs. PEG NAC	-3	-15,23 to 9,232	No	ns	0,9637

MEDIO NAC vs. FUERZAS	-28,5	-40,73 to -16,27	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. FUERZAS NAC	-7	-19,23 to 5,232	No	ns	0,4609
MEDIO NAC vs. PEG	-36,75	-48,98 to -24,52	Yes	****	< 0,0001
MEDIO NAC vs. PEG NAC	0,25	-11,98 to 12,48	No	ns	> 0,9999
FUERZAS vs. FUERZAS NAC	21,5	9,268 to 33,73	Yes	***	0,0005
FUERZAS vs. PEG	-8,25	-20,48 to 3,982	No	ns	0,2969
FUERZAS vs. PEG NAC	28,75	16,52 to 40,98	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS NAC vs. PEG	-29,75	-41,98 to -17,52	Yes	****	< 0,0001
FUERZAS NAC vs. PEG NAC	7,25	-4,982 to 19,48	No	ns	0,4249
PEG vs. PEG NAC	37	24,77 to 49,23	Yes	****	< 0,0001

Anexo 14, Resumen del tratamiento estadístico por ANOVA de doble vía, prueba múltiple de comparación de Tukey para los resultados de la figura 14. Los experimentos fueron realizados por duplicado y el procedimiento se realizó dos veces de manera independiente