



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE MEDICINA
COORDINACIÓN DE ESTUDIO DE POSTGRADO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS
INSTITUTO DE MEDICINA EXPERIMENTAL

**EFFECTO DEL PÉPTIDO NATRIURÉTICO TIPO C SOBRE OSTEÓBLASTOS DE
RATAS NEONATALES EN PRESENCIA DE LIPOPOLISACÁRIDO DE *E.COLI*
SEROTIPO 026:B6.**

Tesis Doctoral que se presenta para optar por el título de
Doctor en Ciencias Fisiológicas

EG. Marcelo A. Alfonzo G.

Tutora: Dra. Fabiola Placeres-Uray

Caracas, Noviembre 2017



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE MEDICINA
COORDINACION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



VEREDICTO

Quienes suscriben, miembros del jurado designado por el Consejo de la Facultad de Medicina y el Consejo de Estudios de Postgrado de la Universidad Central de Venezuela, para examinar la Tesis Doctoral presentada por: MARCELO ANDRES ALFONZO G., titular de la cédula de identidad N° 15.487.981, bajo el título **"EFECTO DEL PÉPTIDO NATRIURÉTICO TIPO C SOBRE OSTEÓBLASTOS DE RATAS NEONATALES EN PRESENCIA DE LIPOPOLISACÁRIDO DE E.COLI SEROTIPO 026:B6"**, a fin de cumplir con el requisito legal para optar al grado académico de DOCTOR EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS, dejan constancia de lo siguiente:

1.- Leído como fue dicho trabajo por cada uno de los miembros del jurado, se fijó el día 24 de Noviembre de 2017 a las 10:00 am, para que el autor lo defendiera en forma pública, lo que este hizo en la Sala de Videoconferencias de la Escuela de Medicina Luis Razetti de la UCV, mediante un resumen oral de su contenido, luego de lo cual el autor respondió satisfactoriamente a las preguntas que le fueron formuladas por el jurado, todo ello conforme con lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

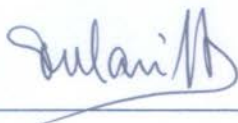
2.- Finalizada la defensa del trabajo, el jurado decidió **APROBARLO**, por considerar, sin hacerse solidario con las ideas expuestas por el autor, que se ajusta a lo dispuesto y exigido en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

Para dar este veredicto, el jurado estimó que el trabajo examinado constituye un aporte original de una simulación in-vitro para el estudio de las patologías óseas. En la defensa y en la escritura de la tesis el aspirante demostró amplio dominio conceptual y excelente organización de las ideas.

3.- El jurado por unanimidad decidió otorgar la calificación de **EXCELENTE** al presente trabajo por considerarlo de excepcional calidad.



En fe de lo cual se levanta la presente ACTA, a los 24 días del mes de noviembre del año 2017, conforme a lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado, actuó como Coordinador del Jurado Fabiola PLACERES.



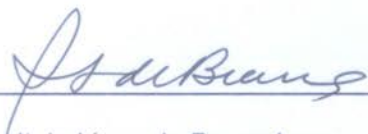
Reinaldo Marín
C.I. 4.245.480
IVIC

Jurado designado por el Consejo
de la Facultad de Medicina



Ernesto Trejo
C.I. 9.096.750
UCV

Jurado designado por el Consejo
de la Facultad de Medicina



Itala Lippo de Becemberg
C.I. 1.875.525
UCV

Jurado designado por el Consejo
Central de Estudios de Postgrado



Marco Álvarez
C.I. 4.585.859
UCV

Jurado designado por el Consejo
Central de Estudios de Postgrado



Fabiola Placeres
C.I. 11.918.557
UCV
Tutora

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

VICERRECTORADO ACADÉMICO

SISTEMA DE INFORMACIÓN CIENTÍFICA, HUMANÍSTICA Y TECNOLÓGICA (SICHT)

FECHA: 21/02/2018

**AUTORIZACIÓN PARA LA DIFUSIÓN ELECTRONICA DE LOS TRABAJOS DE LICENCIATURA,
TRABAJO ESPECIAL DE GRADO, TRABAJO DE GRADO Y TESIS DOCTORAL DE LA
UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA.**

Yo, (Nosotros) Marcelo Andrés Alfonso González
, autor(es) del trabajo o tesis, EFECTO DEL PÉPTIDO NATRIURÉTICO TIPO C SOBRE
OSTEOBLASTOS DE RATAS NEONATALES EN PRESENCIA DE LIPOPOLISACÁRIDO DE E.COLI SEROTIPO 026:B6.
Presentado para optar: Doctor en Ciencias Fisiológicas

Autorizo a la Universidad Central de Venezuela, a difundir la versión electrónica de este trabajo, a través de los servicios de información que ofrece la Institución, sólo con fines de académicos y de investigación, de acuerdo a lo previsto en la Ley sobre Derecho de Autor, Artículo 18, 23 y 42 (Gaceta Oficial N° 4.638 Extraordinaria, 01-10-1993).

✓	Si autorizo
	Autorizo después de 1 año
	No autorizo
	Autorizo difundir sólo algunas partes del trabajo
Indique:	

Firma(s) autor (es)

Marcelo A. Alfonso G.

C.I. N° 15.487.981

e-mail: marceloalfonso@hotmail.com

C.I. N° _____

e-mail: _____

En Caracas, a los 21 días del mes de Febrero de 2018

Nota: En caso de no autorizarse la Escuela o Comisión de Estudios de Postgrado, publicará: la referencia bibliográfica, tabla de contenido (índice) y un resumen descriptivo, palabras clave y se indicará que el autor decidió no autorizar el acceso al documento a texto completo.

La cesión de derechos de difusión electrónica, no es cesión de los derechos de autor, porque este es intransferible.

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR
PARA LA ENTREGA DEL TRABAJO ACADÉMICO
EN FORMATO IMPRESO Y FORMATO DIGITAL

Yo, Fabiola Ayari Placeres Uray portador de la Cédula de identidad N° V-11918557, tutor del trabajo: Efecto del péptido natriurético tipo C sobre osteoblastos de ratas neonatales en presencia de lipopolisacárido de E.coli serotipo 026:B6, realizado por el estudiante: Marcelo Andrés Alfonzo González.

Certifico que este trabajo es la **versión definitiva**. Se incluyó las observaciones y modificaciones indicadas por el jurado evaluador. La versión digital coincide exactamente con la impresa.

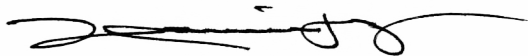

Firma del Profesor

En caracas a los 20 días del mes de Febrero de 2018



Dra. Fabiola Placeres-Uray

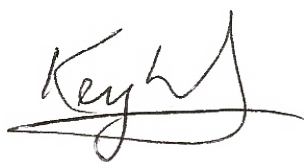
Tutora



Dra. Zury Ana Domínguez

Directora

Curso de Postgrado en Ciencias Fisiológicas



Dra. Keybell M. Díaz G.
Coordinadora Académica
Curso de Postgrado en Ciencias Fisiológicas

DEDICATORIA

Esta tesis la dedico especialmente a la memoria de mi querido padre (†) Marcelo José Alfonzo Rosas, por apoyarme en mi carrera, en mis logros, en todo, que a pesar de tu ausencia física, siento que estás conmigo siempre y aunque nos faltaron muchas cosas por vivir juntos, sé que este momento hubiera sido tan especial para ti como lo es para mí.

De igual forma, hago una dedicación especial para mi amada madre, Ramona González de Alfonzo por ser el pilar más importante y por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional, que sin duda alguna en el trayecto de mi vida me ha demostrado su amor, corrigiendo mis faltas y celebrando mis triunfos.

A mi Hermano Huascar, que con sus consejos me ha ayudado a afrontar los retos que se me han presentado a lo largo de mi vida, que siempre ha estado junto a mí brindándome su apoyo y por compartir conmigo buenos y malos momentos.

A mis grandes amores mi esposa Higbett y a mi hija Agnes, que durante estos años de carrera han sabido apoyarme para continuar y nunca renunciar, gracias por su amor incondicional y por su ayuda en mi Tesis

A Dra. Fabiola Placeres, tutora de la tesis por su valiosa guía y asesoramiento en la realización de la misma.

A mis amigos y profesores del Instituto de Medicina Experimental, muchas gracias por su tiempo, por su apoyo así como por la sabiduría que me transmitieron en el desarrollo de mi formación profesional.

Gracias a todas las personas que me ayudaron directa e indirectamente en la realización de esta tesis doctoral.

Marcelo Andrés Alfonzo González

RESUMEN

EFFECTO DEL PÉPTIDO NATRIURÉTICO TIPO C SOBRE OSTEÓBLASTOS DE RATA NEONATALES EN PRESENCIA DE LIPOPOLISACÁRIDO DE E.COLI SEROTIPO 026:B6.

Marcelo Andrés Alfonso, CI 15.487.981. Sexo: Masculino,
Email: marceloalfonso@hotmail.com. Telef: 0212-3721239/04267175649. Dirección:
UCV, IME, Curso de Doctorado en Ciencias Fisiológicas.
Tutor: Fabiola Placeres-Uray, CI 11.918.557. Sexo: Femenino,
Email: fapuray@hotmail.com. Telef: 0212-6053410. Dirección: UCV, IME,
Sección de Biomembranas. Piso 3 Lab 319.

El efecto del péptido natriurético tipo C (CNP) sobre la proliferación de células osteoblásticas de rata neonatales en cultivo en presencia del Lipopolisacárido (LPS) fue estudiado como una manera de aproximación para entender los mecanismos moleculares y celulares que puedan existir en los osteoblastos expuestos a infecciones bacterianas o a el LPS. En este modelo biológico, la proliferación fue evaluada utilizando el método MTS-PMS. Además, los cultivos de osteoblastos fueron caracterizados por su morfología mediante tinción de H/E y su función mediante la determinación de un marcador específico del osteoblasto como es la fosfatasa alcalina (FA). También se utilizó el rojo de alizarina para determinar de manera cualitativa y cuantitativa, el proceso de osificación como la deposición de hidroxiapatita (HP). La proliferación, la expresión de la FA y la deposición de HP fueron incrementadas por el suero fetal bovino (SFB) y de manera más significativa e importante por el CNP. Además, estos osteoblastos respondieron al LPS y a las interleucinas pro-inflamatorias como la IL-6 y el TNF- α produciendo una inhibición significativa de la proliferación, la FA y de la deposición de HP. Adicionalmente se demostró la existencia del NPR-GC-B. Los osteoblastos expuestos de manera simultánea con CNP y LPS, se encontró que el LPS inhibió de manera significativa, todos los parámetros estimulados por el CNP. Además, el LPS inhibió completamente la actividad de la NPR-GC-B, lo cual es un hallazgo original. Este trabajo experimental permitió entender los mecanismos fisiopatológicos a nivel molecular y celular asociados a las patologías como son los aflojamientos asépticos de los implantes utilizados en la cirugía traumatológica.

PALABRAS CLAVE: Osteoblasto, CNP, LPS

ABSTRACT

EFFECT OF TYPE C NATRIURETIC PEPTIDE ON NEONATAL RAT OSTEOBLASTS IN THE PRESENCE OF E.COLI SEROTYPE LIPOPOLYSACÁRIDE 026: B6.

The effect of C-type natriuretic peptide (CNP) on the proliferation of neonatal rat osteoblastic cells in culture in the presence of lipopolysaccharide (LPS) was studied, as a way of approaching the molecular and cellular mechanisms that may exist in osteoblasts exposed to Bacterial infections or LPS. In this biological model, proliferation was evaluated using the MTS-PMS method. In addition, cultures of osteoblasts were characterized by their morphology by H/E staining and their function by the determination of a specific marker of the osteoblast such as alkaline phosphatase (FA). Alizarin red was also used to qualitatively and quantitatively determine the ossification process, such as hydroxyapatite (HP) deposition. Proliferation, expression of FA and deposition of HP were increased by fetal bovine serum (FBS) and more significantly and importantly by CNP. In addition, these osteoblasts responded to LPS and pro-inflammatory interleukins such as IL-6 and TNF- α producing significant inhibition of proliferation, FA and HP deposition. Additionally, the existence of NPR-GC- B was established. Osteoblasts exposed simultaneously with CNP and LPS, shown that LPS significantly inhibited all parameters stimulated by the CNP. In addition, LPS completely inhibited the NPR-GC-B activity, which is an original finding. This experimental work allows the understanding of the pathophysiological mechanisms at the molecular and cellular levels associated with pathologies such as aseptic loosening of implants used in trauma surgery.

KEYWORDS: Osteoblast, CNP, LPS.

ÍNDICE DE CONTENIDO

PORTADA.....	i
VEREDICTO.....	ii
AUTORIZACIÓN PARA LA DIFUSIÓN ELECTRÓNICA.....	iv
CERTIFICACIÓN DEL TUTOR.....	v
FIRMAS DE TUTORA, DIRECTORA Y COORDINADORA.....	vi
DEDICATORIA.....	vii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	3
INDICE DE TABLAS	5
INDICE DE FIGURAS.....	5
INDICE DE ESQUEMAS.....	8
INDICE DE DIAGRAMAS.....	8
ABREVIATURAS.....	9
INTRODUCCIÓN.....	12
OBJETIVOS	48
Objetivo General.....	48
Objetivos específicos	48
MATERIALES Y MÉTODOS	49
El aislamiento y establecimiento de las condiciones óptimas de los cultivos celulares de osteoblastos.	50
Contaje celular empleando Hemocitómetro y determinación de la viabilidad celular utilizando Azul de tripano al 0,4%.....	53
El ensayo no radioactivo de proliferación celular basado en sales de tetrazolio: MTS-PMS.	54
La determinación enzimática para la fosfatasa alcalina en osteoblastos de rata.	55
La determinación de las proteínas celulares de osteoblastos según el método de Lowry modificado por Bensadoun & Weinstein.....	56
La determinación cualitativa y cuantitativa de la osificación mediante la formación de nódulos de mineralización utilizando el rojo de Alizarina.....	58

La determinación del GMPc como expresión de la actividad de la GC-NPR-B en osteoblastos en cultivo.	60
La tabulación y análisis de los datos.	61
ASPECTOS ADMINISTRATIVOS.	62
RESULTADOS.....	63
1.- El aislamiento y cultivo primario de osteoblastos a partir de calvaria de ratas Sprague Dawley.....	63
2.- La caracterización del fenotipo de la población celular de los osteoblastos en cultivo mediante la tinción de Hematoxilina/eosina y rojo de alizarina.	66
La evaluación de la maduración de los osteoblastos durante el periodo de cultivo celular.	68
3.- Estudio de la proliferación basal de los osteoblastos en cultivo durante 24, 48 y 72 horas y en respuesta al SFB, la IL6, el TNF α , el CNP y al LPS.	70
4.- La actividad de la fosfatasa alcalina en los osteoblastos en cultivo durante 24, 48 y 72 horas y en presencia del SFB, la IL-6, el TNF- α , el CNP y el LPS.	76
5.- La cuantificación del proceso de osificación “in vitro” mediante la determinación de hidroxiapatita utilizando técnicas espectrofotométricas en los osteoblastos en cultivo durante 24, 48 y 72 horas en respuesta al SFB, la IL-6, el TNF- α , el CNP y el LPS.....	84
6.- La determinación de la actividad del NPR-B (receptor del CNP) presente en los osteoblastos en cultivo, mediante la cuantificación del GMPc en distintas condiciones experimentales.....	90
7.-El estudio de las interacciones entre el CNP y el LPS sobre los diversos parámetros vinculados a la actividad osteoblástica como son la proliferación celular, la actividad de la fosfatasa alcalina, la actividad de la NPR-GC y el proceso de osificación “in vitro”	93
DISCUSION.....	100
1.- Establecimiento de las condiciones de aislamiento y cultivo primario de osteoblastos a partir de calvaria de ratas Sprague Dawley	100
2.- La caracterización del fenotipo de la población celular de los osteoblastos en cultivo mediante la tinción de Hematoxilina/eosina y rojo de alizarina.....	104
3.- La proliferación basal en los osteoblastos en cultivo durante 24, 48 y 72 horas y en respuesta al SFB, la IL6, al TNF- α , el CNP y al LPS.	108
4.-La determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina en los osteoblastos en cultivo durante 24, 48 y 72 horas y en presencia del SFB, la IL-6 y el TNF α , el CNP y el LPS.....	112
5.- La evaluación cuantitativa del proceso de osificación “in vitro” mediante la determinación de hidroxiapatita utilizando técnicas espectrofotométricas en los osteoblastos en cultivo durante 24, 48 y 72 horas en respuesta al SFB, la IL-6, el TNF- α , el CNP y el LPS.	115

6.- La determinación de la actividad de la NPR-B (receptor del CNP) presente en los osteoblastos en cultivo, mediante la cuantificación del GMPc en distintas condiciones experimentales.....	120
7.-Estudio de las interacciones entre el CNP y el LPS sobre los diversos parámetros vinculados a la actividad osteoblástica como son la proliferación celular, la actividad de la fosfatasa alcalina, la actividad de la NPR-GC y el proceso de osificación “in vitro”	123
CONCLUSIONES.....	131
REFERENCIAS	133

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fenotipos de ratones y humanos con mutaciones que inactivan a los genes que codifican para péptidos natriurético y sus receptores (86).....	31
Tabla 2. Expresión de receptor péptido natriurético tejidos y líneas celulares (87, 88, 93-95)	32

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Las partes de un hueso largo: epífisis, placa epifisiaria, metáfisis, diáfisis, cavidad medular periostio y cartílago articular. (2)	12
Figura 2. Anatomía del hueso.	14
Figura 3. A) Estructuras morfológicas de un osteoclasto polarizado y distribución de los dominios de membrana de la célula específica y organelos. B) Mecanismo molecular de resorción ósea. Maquinaria molecular implicada en la disolución de la matriz ósea orgánica e inorgánica (7).	16
Figura 4. Diferenciación y maduración de osteoblastos y condrocitos a partir de células progenitoras mesenquimales.	17
Figura 5. A) Proceso de diferenciación, maduración y producción de la matriz extracelular mineralizada (osteóide) por los osteoblastos. El proceso de mineralización finaliza con el paso de los osteoblastos a osteocitos inactivos o células limitantes. B.- Fragmento de material osteóide, coloración de Hematoxilina-Eosina donde se observan los osteoblastos, osteocitos y cartílago mineralizado (14-16).....	18
Figura 6 Esquema del efecto de la PTH sobre el osteoblasto.....	20
Figura 7. Esquema del mecanismo de acción de la PTH sobre su receptor y las dos vías de señalización acopladas a proteínas G: La adenil ciclasa y la fosfolipasa C conduciendo a la activación de genes a nivel nuclear. (24).....	21
Figura 8. Efectos anabólicos de la HC mediante el IGF-1 en osteoblastos humanos (39).	22
Figura 9. Modelo de acción genómica y no genómica de las hormonas esteroideas (40).	23
Figura 10. Organización estructural de los receptores nucleares. Región de estimulación a nivel del ADN (41).	24
Figura 11. Las hormonas sexuales activan la proliferación de los osteoblastos.....	27
Figura 12. Modelo de regulación de los andrógenos y estrógenos sobre el recambio óseo a través de efectos sobre los osteocitos, osteoblastos, osteoclastos y Linfocitos T.....	27

Figura 13. Estructura e irrigación sanguínea de la placa de crecimiento de huesos largos y organización histológica de la placa de crecimiento. (68).	29
Figura 14. La expresión, procesamiento, y estructura del CNP que se expresa en los tejidos como una pre-pro-hormonas.	31
Figura 15. Receptores de péptido natriurético: topología y preferencias por el ligando.	33
Figura 16. Un modelo hipotético para la activación y desensibilización del NPR-A y NPR-B.	36
Figura 17. Crecimiento de huesos largos dependiente de CNP.	37
Figura 18. Variación temporal en la respuesta inflamatoria aguda, respuesta inflamatoria crónica, desarrollo de tejido de granulación y reacción de cuerpo extraño con biomateriales implantados.	38
Figura 19. Interacción entre macrófagos y linfocitos de manera que ayuda a estimular a diferentes tipos de células.	39
Figura 20. Esquema de organización de las membranas de las bacterias gram-negativas y gram-positivas.	40
Figura 21. Esquema de organización de las membranas de las bacterias gram-negativas y la estructura del Lipopolisacárido (LPS).	41
Figura 22. Especificidad del ligando por su receptor. Los receptores toll reconocen una diversidad de patrones moleculares asociados a patógenos, tales como: bacterias, virus, protozoarios y hongos. (142)	43
Figura 23. Estructura Cristalina del TLR-4.	44
Figura 24. Modelo de la señalización del LPS.	45
Figura 25. A. Ratas recién nacidas Sprague-Dawley. B. Cabeza donde está marcada en círculo rojo la calvaria. C. Las calvarias (n=3) de ratas Sprague-Dawley en placa de Petri con DMEM que fueron procesadas como se describe en la Metodología.	64
Figura 26. El cultivo de osteoblastos a las 24 h con un 15 % de confluencia.	64
Figura 27. Cultivo de osteoblastos 48 h con un 50 % de confluencia.	65
Figura 28. El cultivo de osteoblastos a las 72 h con un 95-98 % de confluencia.	65
Figura 29. Cultivo de osteoblastos.	66
Figura 30. A: Micrografía de osteoblastos inmaduros (24 h) teñidos con rojo de alizarina al 2%. A- Se observan células fusiformes (osteoblastos inmaduros) con microscopio Olympus XT1 de Fluorescencia sin filtro. B- Los mismos osteoblastos pero usando Filtro YEP 490-500 nm, evidenciando la ausencia de depósitos de calcio intracelular. Barra 0,11 mm.	67
Figura 31. Micrografía de un osteoblasto maduro (72 h) teñido con rojo de alizarina al 2%. A- Osteoblasto observado con microscopio Olympus IXT1 de Fluorescencia sin filtro. B- Usando el Filtro YEP 490-500 nm, el mismo osteoblasto mostró depósitos de calcio intracelular teñido con rojo de alizarina característicos de estas células. Barra 0,11 mm. .	68
Figura 32. Los cultivos de osteoblastos en distintos tiempos: 24, 48 y 72 h bajo microscopio de luz (10X), la coloración de H/E y la tinción de rojo de alizarina (RA).	69
Figura 33. El efecto del Suero Fetal Bovino sobre la proliferación de osteoblastos en cultivo utilizando el método MTS-PMS (Absorbancia a 492 nm).	71
Figura 34. El efecto del tiempo de cultivo y de diferentes concentraciones del SFB sobre la proliferación de osteoblastos evaluando la concentración de proteínas celulares como se describe en la Metodología.	72
Figura 35. El efecto de concentraciones crecientes de IL-6 sobre la proliferación de osteoblastos en función del tiempo de cultivo.	73
Figura 36. El efecto del TNF- α sobre la proliferación de osteoblastos en función del tiempo de cultivo.	73

Figura 37. El efecto del CNP sobre la proliferación de los osteoblastos en función del tiempo de cultivo.....	74
Figura 38. El efecto del LPS sobre la proliferación de los osteoblastos en función del tiempo de cultivo.....	75
Figura 39. Gráfica resumen sobre el efecto del SFB 20%, el CNP (100 nM), la IL-6 (100 ng/ml), el TNF- α (100 ng/ml) y el LPS (100 ng/ml) sobre la proliferación de los osteoblastos a las 72 h de cultivo	76
Figura 40. La curva de estandarización de la actividad de la fosfatasa alcalina (FA) en osteoblastos de 72 h de cultivo.....	77
Figura 41. Actividad de fosfatasa alcalina en función de tiempo de ensayo.	78
Figura 42. La actividad de FA a diferentes tiempos: 24, 48 y 72 h y utilizando SFB a distintas concentraciones: 0% (Basal), 5%,10% y 20%.	79
Figura 43. El efecto de la IL-6 sobre la actividad de FA en osteoblastos en función del tiempo de cultivo.....	80
Figura 44. El efecto del TNF- α sobre la actividad de FA en osteoblastos en función del tiempo de cultivo.	81
Figura 45. El efecto del LPS sobre la actividad de FA en osteoblastos en función del tiempo de cultivo.....	82
Figura 46. El efecto del CNP sobre la actividad de FA en osteoblastos en función del tiempo de cultivo.	83
Figura 47. La curva de calibración de la hidroxiapatita. Las muestras de hidroxiapatita (50-1000 μ g) fueron colocadas en tubos Eppendorf y se les añadió 200 μ l de Rojo de Alizarina al 2%, para luego ser procesadas como fue descrito en la sección de Metodología.....	84
Figura 48. El efecto del Suero Fetal Bovino (SFB) en función del tiempo sobre la formación de hidroxiapatita en cultivos de osteoblastos.	85
Figura 49. El efecto del péptido natriurético C (CNP) en función del tiempo sobre la formación de hidroxiapatita en cultivos de osteoblastos.	86
Figura 50. El efecto de la interleuquina 6 (IL-6) en función del tiempo sobre la formación de hidroxiapatita en cultivos de osteoblastos.	87
Figura 51. El efecto del TNF- α en función del tiempo sobre la formación de hidroxiapatita en cultivos de osteoblastos.....	88
Figura 52. El efecto del lipopolisacárido (LPS) en función del tiempo sobre la formación de hidroxiapatita en cultivos de osteoblastos.	89
Figura 53. La curva de calibración para la determinación del GMPc utilizando la técnica del radioinmunoensayo.	91
Figura 54. El efecto del CNP sobre la producción del GMPc en osteoblastos a las 48 h en cultivo.....	92
Figura 55. Efecto del CNP sobre la producción del GMPc en osteoblastos a las 72 h en cultivo.	92
Figura 56. El efecto del LPS sobre la proliferación de los osteoblastos inducida por el CNP a 48 y 72 h en cultivo.	94
Figura 57. La estimación de la IC ₅₀ para el LPS sobre la proliferación de los osteoblastos a las 72 h de cultivo.....	95
Figura 58. Efecto del LPS sobre la actividad de FA inducida por el CNP (100 nM) en osteoblastos a las 48 y 72 h de cultivo.	96
Figura 59. El efecto del LPS sobre la producción de hidroxiapatita inducida por el CNP (100 nM) en osteoblastos a las 48 y 72 h de cultivo.	97

Figura 60. El efecto del LPS sobre la producción del GMPc dependiente del CNP en osteoblastos a las 48 h en cultivo.....	98
Figura 61. El efecto del LPS sobre la producción del GMPc dependiente del CNP en osteoblastos a las 72 h en cultivo.....	99
Figura 62. Alizarina El rojo de Alizarina S. se utiliza para identificar calcio en secciones de tejido, mediante un proceso de quelación	105
Figura 63. Modelo que ilustra la formación de HP en el osteoblasto.	116
Figura 64. Modelo de la señalización del LPS. Vía de activación de las MAPK a través de la activación del TLR-4 mediante el LPS. (139).....	125
Figura 65. Modelo de la NPR-GC-B (Tomado de la Referencia 104).....	129
Figura 66. Estructura del LPS: Lipido A, núcleo de oligosacáridos y el antígeno”O”.	130
Figura 67. Estructura del Lipido A del LPS de E.coli.	130

INDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Aislamiento y cultivo de osteoblastos primarios de calvarías de ratas neonatales Sprague Dawley.....	51
Esquema 2. Protocolo de formación de hueso de osteoblastos en cultivos de calvarías de ratas neonatales Sprague Dawley.....	52

INDICE DE DIAGRAMAS

Diagrama 1. Hemocitómetro (cámara de Neubauer) para el conteo celular.	53
---	----

ABREVIATURAS

AC: Adenilil ciclase

ACTH: Hormona adrenocorticotropa

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ATC: Ácido tricloroacético.

ATP: adenosín trifosfato

BSA: Albumina de suero bovino (Bovine serum albumin)

CREB: Proteína de unión de elementos de respuesta a cAMP (cAMP-response element-binding protein)

CNP: Del inglés C-type Natriuretic Peptide: Péptido natriurético tipo C.

Col: Colágeno

Cu²⁺: Cobre

CuSO₄: Sulfato de cobre

DAG: Diacilglicerol

DEX: Dexametasona

DOC: Deoxicolato

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's médium

DMEMos: Ossification Dulbecco's Modified Eagle's medium o DMEM osificación

DMEMs: Supplemented Dulbecco's Modified Eagle's medium o DMEM suplementado

EDTA: ácido etildiaminotetraacético

FA: Fosfatasa alcalina

GC-A: Guanilil Ciclasa A.

GC-B: Guanilil Ciclasa B.

GMPc: Guanosín monofosfato cíclico

GPCR: Del inglés G Protein-Coupled Receptor: Receptor acoplado a proteínas G.

GTP: Guanosín trifosfato

HC: Hormona de crecimiento

H/E: Hematoxilina-Eosina

HP: Hidroxiapatita

IL-6: Interleucina 6

IP3: Inositol trisfosfato

IGF-I, IGF-II: Del inglés Insulin-like Growth Factor I, II: Factor de Crecimiento similar a la Insulina I y II.

JAK-2 Del inglés Janus Kinase-2: Quinasa Janus-2.

JNK: Del inglés c-Jun N-Terminal Kinase: Quinasa N-terminal de c-Jun.

LPS: Lipopolisacárido

MAL/MKL-1: Del inglés Megakaryocytic Acute Leukemia/ Megakaryoblastic Leukemia-1: Leucemia Megacariocítica Aguda/ Leucemia Megacarioblástica -1.

MAPK: Del inglés Mitogen Activated Protein Kinase: Quinasa activada por mitógenos.

MEC: matriz extracelular de colágeno.

MD-2: Lymphocyte Antigen 96

mg: miligramo

MgCl₂: Cloruro de Magnesio.

MTS-PMS: Complejo de (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-~3-carboxymethoxyphenyl)-2~4sulfophenyl)-2H-tetrazolium /phenazine methosulfate.

MAPK: Del inglés Mitogen Activated Protein Kinase: Quinasa activada por mitógenos.

NPR: Receptor de péptidos natriuréticos

NPR-B: Guanilciclasa activada por el péptido natriurético CNP.

OC: Osteocalcina

OPG: Osteoprotegerina.

Osx: Osterix(factor de transcripción)

PGE₂: Prostaglandina E2

p-NPP: p-nitrofenilfosfato

PKA: Proteína quinasa A

PKC: Proteína quinasa C

PLC: Fosfolipasa C

PN: Péptido Natriurético

PTH: Paratohormona

PTHrP: Receptor para Paratohormona

RA: Rojo de Alizarina

RANKL: Ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B

RHC: Receptor de hormona de crecimiento

RN: Receptor nuclear

Runx2: Factor de transcripción 2 relacionado con Runt (runt-related transcription factor 2)

SFB: Suero fetal bovino

SOST: Gen SOST/esclerotina

TGF: Factor de crecimiento transformante

TLR: Toll like receptor

TNF- α : Del inglés Tumor Necrosis Factor- α : Factor de Necrosis Tumoral- α .

INTRODUCCIÓN

El sistema esquelético está representado por los huesos, los cuales pueden ser clasificados en tres grupos: cortos, planos y largos. Los huesos cortos, como, los carpianos y las vértebras, miden aproximadamente lo mismo en todas sus direcciones, pueden ser de forma trapezoidal, cúbica, cuneiformes o de forma irregular. Los huesos planos como por ejemplo, la escápula y las crestas ilíacas. Los huesos largos tienen una dimensión que es mucho mayor que las otras dos, como por ejemplo el fémur, la tibia, el húmero, los metacarpianos, los metatarsianos y las falanges. Éstos tienen una zona tubular de gran espesor, la diáfisis, que termina expandiéndose a cada extremo, la metáfisis. Adicionalmente, en el hueso largo por encima de la metáfisis se encuentra la epífisis, y entre ellas una zona cartilaginosa denominada placa epifisaria. La diáfisis posee la cavidad medular o conducto medular que es la parte interna del hueso largo. El periostio que recubre la diáfisis y por último el cartílago articular que forma parte fundamental de las articulaciones. (Figura 1) (1).

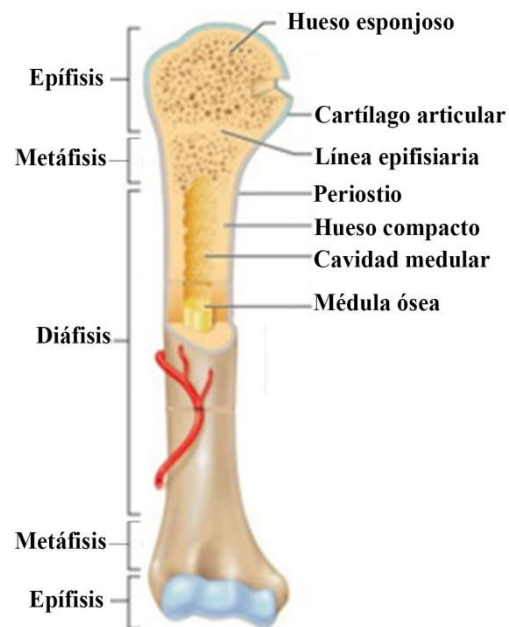


Figura 1. Las partes de un hueso largo: epífisis, placa epifisaria, metáfisis, diáfisis, cavidad medular periostio y cartílago articular. (2)

En general, el tejido óseo está compuesto esencialmente por tejido conjuntivo con la sustancia intercelular mineralizada, siendo, entre todos los tejidos conectivos, el único que responde a la denominación de tejido duro, lo cual garantiza varias funciones esenciales entre las que destacan las siguientes (1,2):

- Proveer de estructura y soporte al cuerpo, en especial al sistema muscular y garantizar la protección de órganos vitales.
- Actuar como reserva de elementos químicos como son el calcio, magnesio y fosfato y además ser el responsable con el sistema endocrino del mantenimiento de la homeostasis del calcio, magnesio y fosfato.
- Ser el lugar de mayor formación de glóbulos rojos y blancos, sitio donde se localiza la médula ósea en el interior de los huesos.

Existen dos tipos fundamentales de tejido óseo: cortical (o compacto) y esponjoso (o trabecular) (2, 3). (Figura 2). Ambos tienen la misma composición y estructura, pero la masa de hueso cortical por unidad de volumen es mucho mayor, o lo que es lo mismo, tiene menor porosidad (aproximadamente 10% para el hueso cortical y del 50 al 90% para el esponjoso).

El hueso cortical (Hueso compacto o Haversiano) se caracteriza por ser denso y compacto, representa aproximadamente el 85% del hueso corporal, se encuentra en la diáfisis de los huesos largos, es homogéneo y muy resistente. La superficie externa está cubierta por el periostio formado por una capa exterior del tejido fibroso rica en vasos, nervios y terminaciones sensitivas; en ellas se insertan ligamentos y tendones (Figura 2). La porción interna del hueso cortical está formada por los sistemas de Havers y se relacionan entre sí por las anastomosis de canales de Havers y el conducto medular, por medio de los canales de Volkmann (Figura 2) (3).

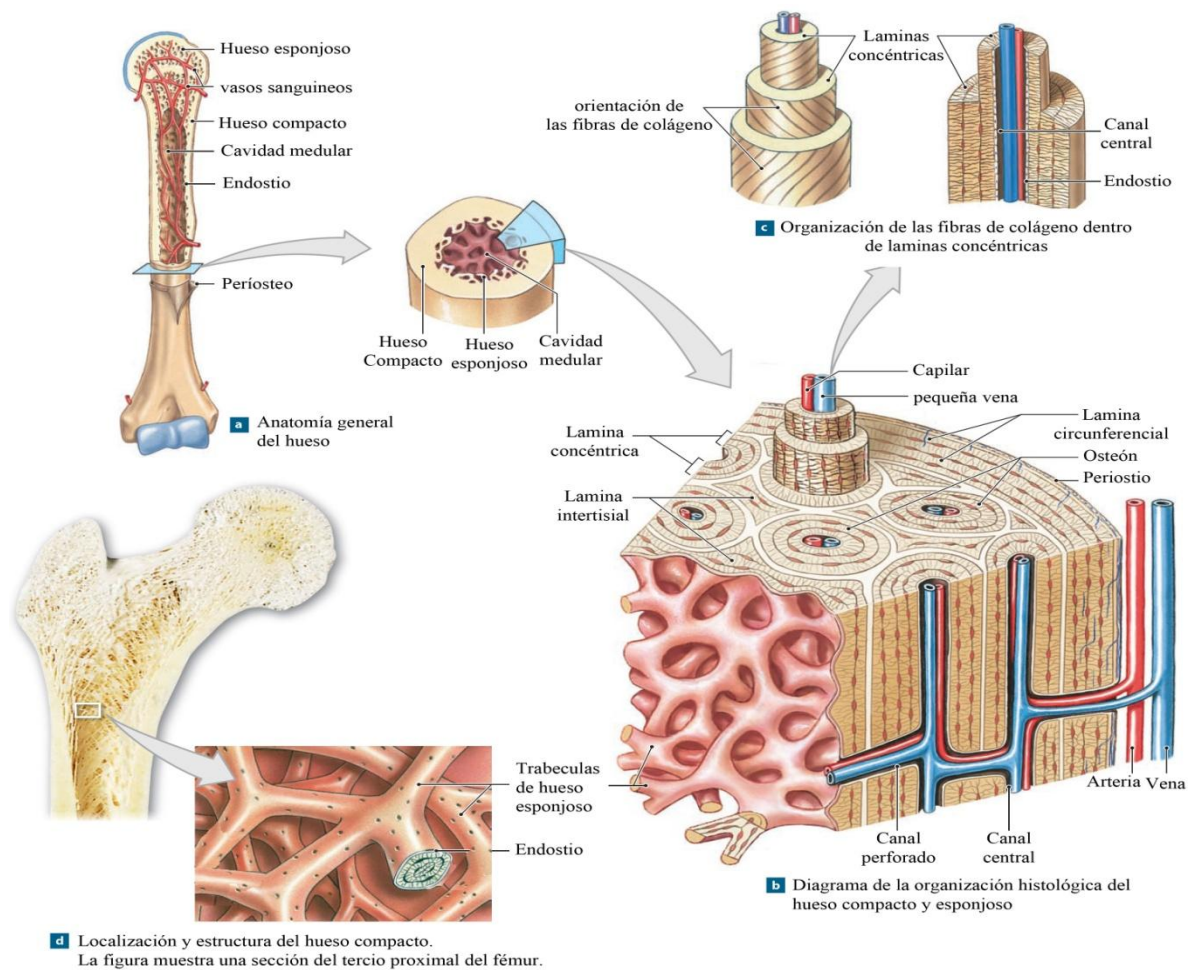


Figura 2. Anatomía del hueso.

a) Anatomía general b) Vista macro de la organización del hueso, c) Vista micro de la organización del hueso y d) El osteón (3)

Además del carácter estructural del hueso, este tejido posee la capacidad de adaptarse a las influencias mecánicas, a las que se encuentra sometido, variando tanto su microestructura interna como su forma externa.

Es importante enfatizar que el tejido óseo es una estructura viva, activa y compleja, que se encuentra en proceso continuo de remodelamiento dinámico (formación de tejido nuevo y eliminación del antiguo) el cual se modifica en función del ejercicio, tipos y magnitudes de cargas y factores metabólicos.

El hueso está compuesto de una población heterogénea de células tales como: osteocitos, osteoclastos, condrocitos y osteoblastos (4).

Los osteocitos.

Los osteocitos tienen la capacidad de producir o reabsorber la matriz ósea que les circunda, de hecho se podría decir que estas células se han quedado atrapadas en su propia sustancia de secreción. A pesar de la distancia que hay entre los osteocitos, y de la cantidad de matriz que los separa, éstos permanecen en contacto a través de pequeños canales que hay a lo largo del hueso. La comunicación de los osteocitos es importante para controlar la cantidad de hueso que se produce y deteriora (4,5) Se ha determinado que los osteocitos tienen una función de sensor de carga mecánica, a medida que aumenta la carga en el hueso aumenta la formación de matriz ósea y al disminuir la carga disminuye la formación de matriz ósea (6)

Los osteoclastos.

El osteoclasto es una célula multinucleada, móvil, gigante, que degrada, reabsorbe y remodela el tejido óseo. Al igual que el osteoblasto, está implicado en la remodelación del hueso. Los osteoclastos, células responsables de la resorción de la matriz ósea, son células acidófilas y polinucleadas de gran tamaño. Dichas células ocupan una cavidad llamada laguna de resorción o laguna de Howship como se observa en la figura 3 y se localizan en las superficies óseas firmemente asociadas a la matriz ósea (7). Los osteoclastos se forman por la fusión de varias células mononucleares derivadas de una célula madre sanguínea proveniente de la médula ósea, mostrando muchas propiedades de los macrófagos, formando parte del sistema monocítico-macrofágico (4,7,8).

Los osteoclastos se caracterizan por poseer una porción de su membrana “arrugada”, en forma de cepillo, rodeada de un citoplasma libre de orgánulos llamada “zona clara”, con la que se adhiere a la superficie del hueso mediante integrinas, unos receptores especializados del hueso. El proceso de resorción se inicia cuando las células liberan enzimas lisosomales y además son capaces de producir un microambiente ácido por debajo de la membrana arrugada como consecuencia del transporte de protones mediante la bomba de protones ATP-dependiente, el intercambio Na^+/H^+ y la anhidrasa carbónica. Las enzimas lisosomales de los osteoclastos implicadas en este proceso son proteasas como la catepsina y sobre

todo, la fosfatasa ácida tartrato-resistente (esta última se utiliza como marcador del fenotipo osteoclástico). (7,8) Las enzimas lisosomales sólo son liberadas en la zona clara en las proximidades del borde arrugado produciéndose en esta área las reacciones de degradación de la matriz que deben ocurrir antes de que el medio ácido disuelva las sales minerales del hueso.

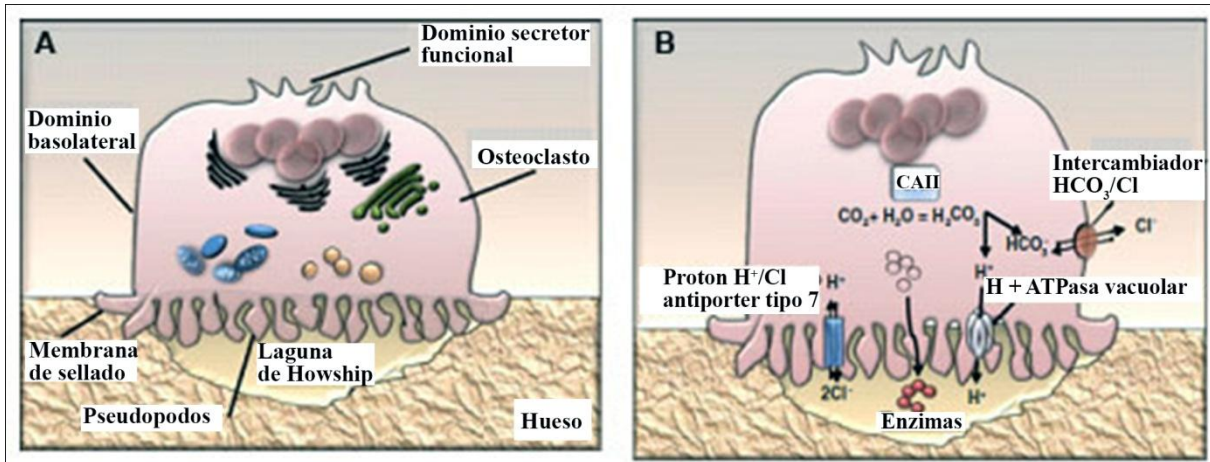


Figura 3. A) Estructuras morfológicas de un osteoclasto polarizado y distribución de los dominios de membrana de la célula específica y organelos. B) Mecanismo molecular de resorción ósea. Maquinaria molecular implicada en la disolución de la matriz ósea orgánica e inorgánica (7).

Los condrocitos.

Los condrocitos son un tipo de célula que se encuentran en el cartílago. Estas células son el único componente celular de este tejido y se encargan de mantener la matriz cartilaginosa, a través de la producción de sus principales compuestos: colágeno y proteoglicanos (9). Los condrocitos conforman sólo el 5% del tejido cartilaginoso, pero son esenciales para el mantenimiento de la matriz extracelular que comprende el 95% de este tejido (10)

Los osteoblastos.

Los osteoblastos son células óseas especializadas en producir matriz ósea, formada de cristales de hidroxiapatita, que están compuestos principalmente de fosfato y calcio. Los osteoblastos aun mantienen la capacidad para replicarse, hasta que son rodeados de matriz ósea mineralizada y pasan a un estado de mantener dicha matriz y son denominados osteocitos (4,11) Los osteoblastos tienen receptores

para la paratohormona y para la calcitonina, hormonas secretadas por la paratiroides y la tiroides respectivamente, antagonistas entre sí para mantener la homeostasis del calcio y fósforo (12).

Los osteoblastos se diferencian a partir de células progenitoras mesenquimales como se puede observar en la Figura 4. La diferenciación y maduración de los osteoblastos está principalmente mediada por Runx2 (Factor de transcripción 2 relacionado con Runt o runt-related transcription factor 2) y Osterix (factor de transcripción) induciendo a los osteoblastos para que expresen marcadores específicos de osteoblastos maduros. Por otra parte, las células no-osteogénicas tales como adipocitos, células vasculares endoteliales, y las células estromales, están presentes de manera abundante en la médula ósea, y se considera que participan en la regulación de la función del hueso (13).

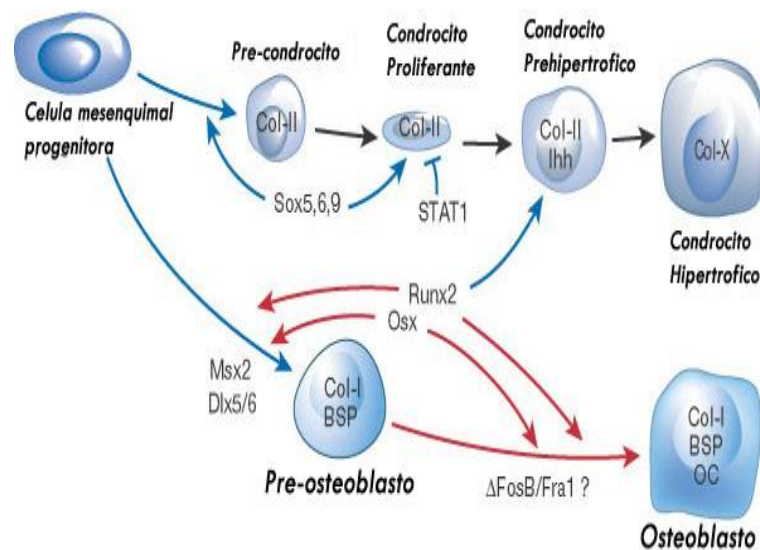


Figura 4. Diferenciación y maduración de osteoblastos y condrocitos a partir de células progenitoras mesenquimales.

Runx2 es esencial para la diferenciación de los pre-osteoblastos a osteoblastos y también participa en la maduración de los condrocitos. Osterix (Osx) actúa a nivel de Runx2 para inducir la maduración de los osteoblastos que expresan marcadores de osteoblastos, incluyendo osteocalcina. Col-I: Colágeno tipo I. BSP, sialoproteína de hueso. OC, Osteocalcina. (13)

La formación del hueso implica una serie compleja de procesos que incluyen la proliferación y la diferenciación de las células osteoprogenitoras a osteoblastos,

que resulta en la producción de una matriz extracelular, llamada osteoide, la cual es posteriormente mineralizada. En la Figura 5, se propone un modelo sobre el proceso de diferenciación y maduración de los osteoblastos iniciando con la producción de osteoide, continúa con la mineralización y finalizando este proceso con el paso de los osteoblastos a osteocitos inactivos o células limitantes. En este sentido, se han desarrollado varios modelos para estudiar la diferenciación de las células formadoras de hueso *in vitro* (14) y la biología molecular del proceso de la mineralización (15, 16).

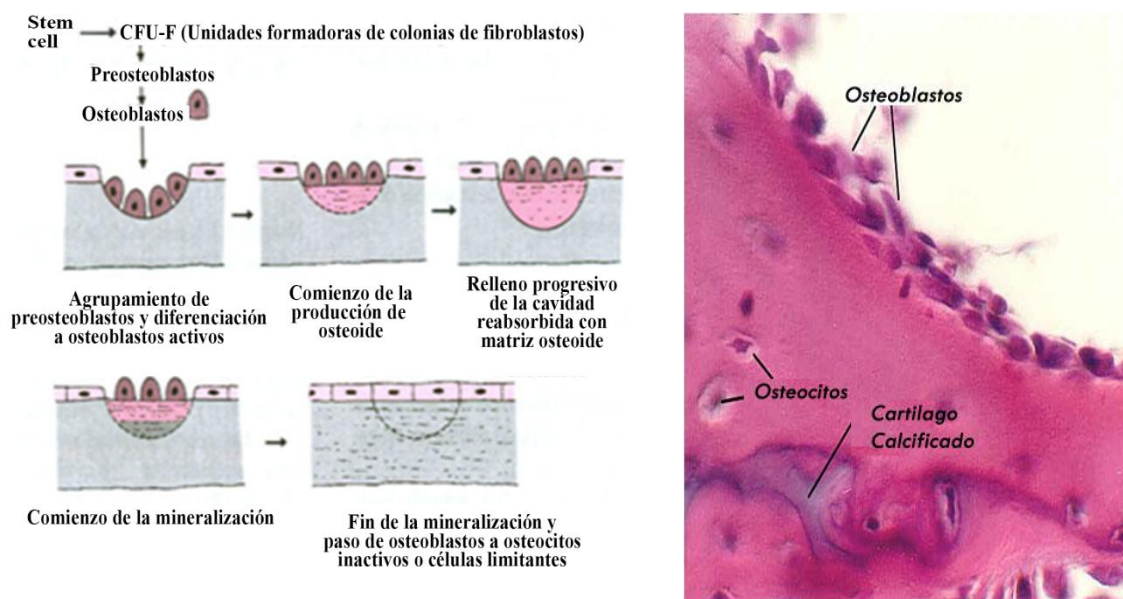


Figura 5. A) Proceso de diferenciación, maduración y producción de la matriz extracelular mineralizada (osteoide) por los osteoblastos. El proceso de mineralización finaliza con el paso de los osteoblastos a osteocitos inactivos o células limitantes. B.- Fragmento de material osteoide, coloración de Hematoxilina-Eosina donde se observan los osteoblastos, osteocitos y cartílago mineralizado (14-16).

La masa ósea es un balance dinámico entre la acción productora de matriz ósea del osteoblasto y la acción degradadora de los osteoclastos. En este sentido, la función primaria de los osteoblastos es sintetizar y mineralizar la matriz extracelular. Los elementos citoplasmáticos del osteoblasto incluyen un abundante retículo endoplásmico con cisternas, un Golgi bien definido, y numerosos ribosomas libres que son responsables del aspecto basófilo observado en las tinciones de hematoxilina y eosina. Estas características, permiten distinguir los osteoblastos de

los precursores mesenquimales delgados y planos (preosteoblastos) que se encuentran en la superficie del hueso (17).

Factores que afectan la fisiología del osteoblasto.

Existen varias hormonas que estimulan la diferenciación y la proliferación de los osteoblastos. Las hormonas más importantes son la paratohormona (PTH), la hormona de crecimiento (HC), las hormonas esteroideas (andrógenos, estrógenos y glucocorticoides) y el péptido natriurético tipo C (CNP).

La Paratohormona (PTH).

La PTH es una hormona peptídica secretada por la glándula paratiroides que interviene en la regulación del metabolismo del calcio y del fósforo (18). Recientemente se han demostrado los efectos catabólicos y anabólicos de la PTH sobre el sistema óseo. Los efectos directos de la PTH sobre los osteoblastos y osteocitos y los efectos indirectos en los osteoclastos, promueven ambos, formación y resorción ósea. El efecto anabólico o catabólico final sobre la masa ósea parecen depender de la duración y periodicidad de la exposición de PTH. Mientras que la PTH estimula la remodelación ósea general, la resorción ósea predomina con la exposición continua de altos niveles de PTH (19), mientras que la administración de dosis bajas e intermitentes de PTH conduce a un aumento neto en la masa ósea (20, 21). Las dos formas de exposición de PTH, continua o intermitente, regulan, en el hueso diferentes conjuntos de genes o alternativamente, afectan los mismos grupos de genes en forma sostenida vs la forma transitoria, la primera favoreciendo la reabsorción y la segunda la formación ósea (22).

En la Figura 6 se presenta un resumen de los efectos anabólicos de la PTH sobre los osteoblastos induciendo la diferenciación, proliferación y sobrevivencia de dichas células, lo cual está relacionado al anabolismo del tejido óseo.



Figura 6 Esquema del efecto de la PTH sobre el osteoblasto.

Se demuestra los efectos anabólicos induciendo la diferenciación, proliferación y supervivencia de los osteoblastos. (20)

La activación del receptor de la PTH (PTHrP) presente en los osteoblastos y en el riñón, produce la activación de varias vías de señalización intracelulares que incluye las dos clásicas cascadas receptores acoplados a proteínas G (GPCR) como son, la adenil ciclasa (AC) y la fosfolipasa C (PLC) (23, 24). La estimulación de la cascada de señalización de AC conduce a la activación de la proteína quinasa A (PKA) y la fosforilación de factores de transcripción, como son la proteína de unión de elementos de respuesta a cAMP (CREB o cAMP-response element-binding protein) que regula la transcripción de genes asociados a la acción de la PTH. La estimulación de la cascada de señalización de la PLC lleva a la acumulación de inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG); El IP3 aumenta la concentración de calcio intracelular, mientras que el DAG activa la proteína quinasa C (PKC); produciendo efectos genómicos a través de factores de transcripción regulados por el calcio y la PKC. Un resumen de los mecanismos moleculares antes mencionados se ilustra en Figura 7 (23, 24).

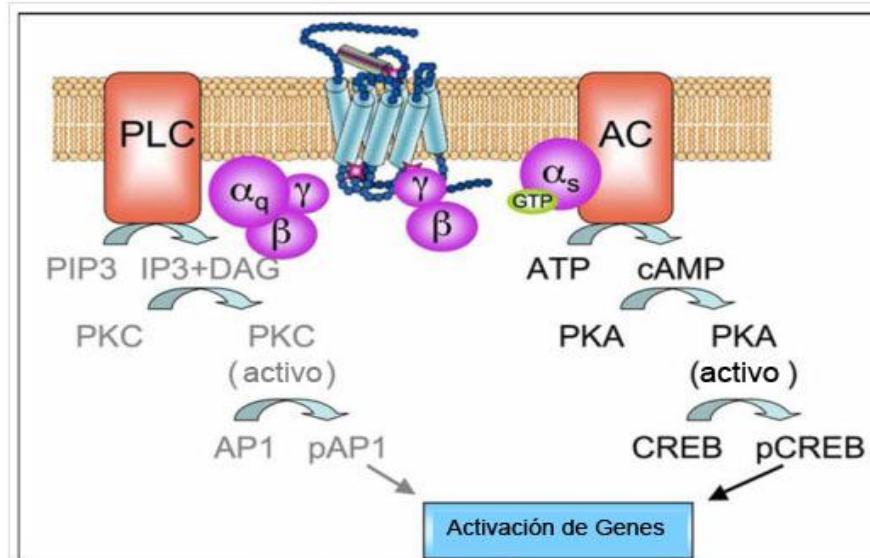


Figura 7. Esquema del mecanismo de acción de la PTH sobre su receptor y las dos vías de señalización acopladas a proteínas G: La adenil ciclasa y la fosfolipasa C conduciendo a la activación de genes a nivel nuclear. (24)

Adicionalmente, la señalización mediante el receptor PTHrP en osteoblastos y osteocitos puede aumentar la proporción Osteoprotegerina/ (Ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B (OPG/RANKL), que es el principal mecanismo por el cual la PTH estimula la resorción ósea. En cambio, en la formación ósea inducida por la PTH se explica, al menos en parte, por su capacidad para regular la expresión de SOST/esclerostina en los osteocitos, activando la vía de señalización Wnt anabólica. Así, actualmente se postula que la PTH utiliza ambas vías: la parte catabólica (OPG/RANKL/RANK) (25) y la anabólica (Gen SOST/esclerostina). (26)

La hormona de crecimiento (HC).

La hormona de crecimiento (HC) o llamada somatotropina, es una hormona peptídica de 191 aminoácidos de una sola cadena que estimula la reproducción celular y la regeneración de células en humanos y otros mamíferos con función de citoquinas (27). La HC es almacenada y secretada por las células somatotropas dentro de las adenohipófisis. (28). Las acciones de la HC están mediadas por la unión de la hormona a su receptor transmembrana Receptor de hormona de crecimiento (RHC), provocando la activación de las Quinasas Janus (JAKs) (29)

conduciendo a la activación de los transductores de señal y activadores de transcripción (STATs – signal transducers and activators of transcription) (30, 31), la fosfatidilinositol 3-quinasa/Akt (32) y la ERK (33).

La HC desempeña un papel importante en el crecimiento óseo longitudinal postnatal. Este efecto de modelado de HC es debido a su capacidad para estimular las células del precursor en el cartílago epifisario (34,35).

Recientes estudios han sugerido que la HC también puede participar en el proceso de renovación continuo del esqueleto humano adulto (remodelación) (36, 37).

Los efectos a corto plazo de la HC sobre la biología de los osteoblastos cultivados es estimular la proliferación, de una manera dosis dependiente de esta hormona. Estos efectos mitogénicos son perceptibles dentro de 24 horas en células de cultivos. La HC aumentó los niveles de fosfatasa alcalina y en menor grado los niveles de procolágeno Tipo I.

Adicionalmente, se ha demostrado que en los osteoblastos existen interacciones entre la HC y el factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF-1) en osteoblastos (38). Así, se ha establecido que la HC ejerce un efecto anti-apoptótico a través de mecanismos vinculados al IGF-1, pero de manera aguda no puede aumentar el número de osteoblastos “in vivo” en la ausencia de un receptor de factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF-1R) intacto.

Por lo tanto, los principales efectos anabolizantes de la HC es ejercida mediante el aumento de la producción de IGF-1 y la posterior acción de este factor de crecimiento en la proliferación de los osteoblastos (39). Como se observa en la Figura 8, la HC ejerce efectos anabólicos directos en osteoblastos humanos mediante el IGF-1.

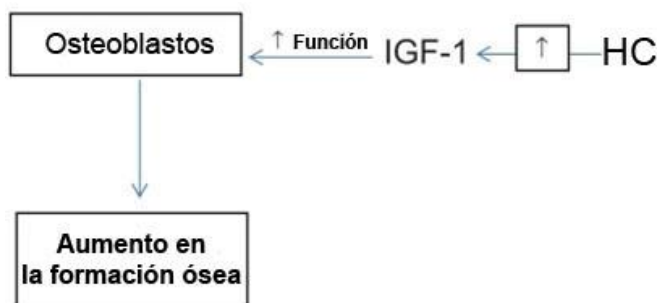


Figura 8. Efectos anabólicos de la HC mediante el IGF-1 en osteoblastos humanos (39).

Las hormonas esteroideas.

Las hormonas esteroideas son derivados del anillo ciclopentanoperhidro-fenantreno (colesterol) entre las que se encuentran glucocorticoides, progestágenos, estrógenos, andrógenos y mineralocorticoides y que clásicamente sus receptores celulares se describieron a nivel nuclear o citoplasmático, que son los receptores nucleares (RN) asociados a los efectos genómicos de estas hormonas (40). Recientemente se han descrito receptores a nivel de la membrana plasmática que parecen mediar los efectos no-genómicos de estas hormonas (40).

En la Figura 9 se esquematiza estas 2 formas de regulación celular de los receptores para las hormonas esteroideas. Así, el esteroide interactúa en primera instancia con un receptor a nivel de la membrana plasmática donde activan vías de señalización celular (segundos mensajeros) que puede conducir a cambios rápidos (dentro de segundos o minutos) en el comportamiento celular. . Posteriormente, el esteroide se une a receptores citoplasmáticos y este complejo hormona/receptor migra al núcleo y son denominados los receptores nucleares (RN), los cuales alteran la expresión genética induciendo la producción de ARNm específicos. Este proceso está asociado a los mecanismos genómicos que pueden durar horas o días para afectar el comportamiento celular.

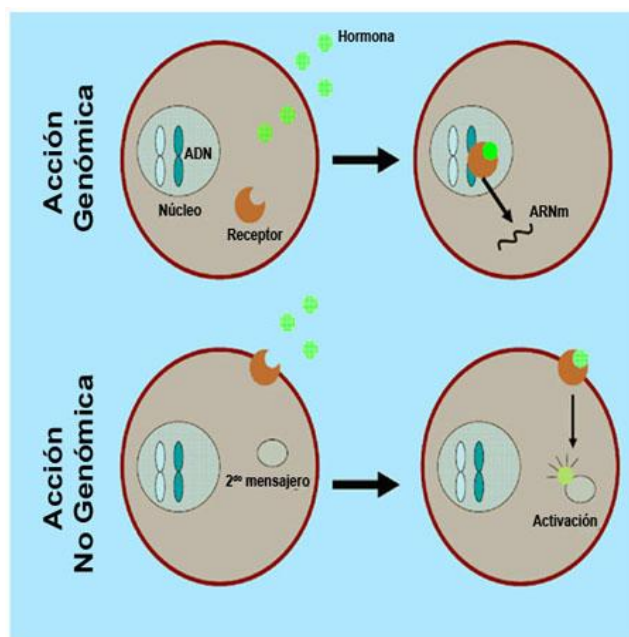


Figura 9. Modelo de acción genómica y no genómica de las hormonas esteroideas (40).

Los RN de las hormonas esteroideas son una clase de factores de transcripción dependientes de ligando como se observa en la Figura 10. Al ocurrir la unión del ligando con su receptor, en el dominio del receptor (LBD) éstos se homo o hetero-dimerizan y regulan la expresión genética a través de múltiples mecanismos. Los ligandos unidos a su RN pueden regular de manera positiva la transcripción después que los dominios de unión al ADN (DBD) de los RN dimerizados se unen a las secuencias de promotores que contiene los sitios de unión al ADN (41, 42).

Recientemente se ha descrito que los co-activadores accesorios y proteínas co-represoras interactúan directamente o indirectamente con el RN y desempeñan un papel clave en la regulación transcripcional. Estas proteínas asociadas con el RN pueden influenciar la organización de la cromatina y/o reclutamiento de factores de transcripción basales y la ARN polimerasa II para producir ARNm. El patrón de genes modulados dentro de una célula en respuesta a la unión del ligando al RN determinan los efectos tardíos sobre la proliferación, diferenciación y la homeostasis celular. (41, 42)

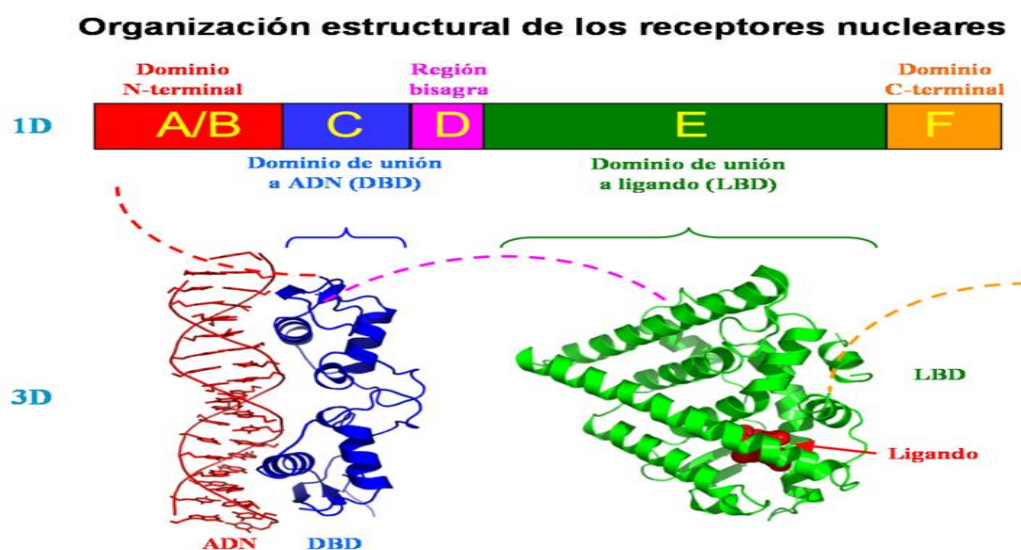


Figura 10. Organización estructural de los receptores nucleares. Región de estimulación a nivel del ADN (41).

La estructura del RN se esquematiza 5 dominios, a saber. El dominio A/B en el N-terminal, luego se encuentra el dominio C de unión al ADN (DBD). A continuación, un dominio bisagra (D) que es esencial en la flexibilidad de la molécula del receptor. El dominio E (LBD) de unión del ligando (esteroide), el cual es específico para cada tipo de hormona esteroidea y finalmente el dominio del C-terminal (F).

Los esteroides sexuales.

Estas hormonas esteroideas son los andrógenos y los estrógenos.

Los andrógenos como la testosterona, dihidrotestosterona y otros andrógenos son responsables de características sexuales secundarias y el comportamiento de los hombres (43).

Los estrógenos son sintetizados por los ovarios en mujeres premenopáusicas. La función de los estrógenos es mantener las características sexuales secundarias y de la integridad ósea de las mujeres. (44)

Los andrógenos.

Los andrógenos son sintetizados por los testículos en los hombres, en los ovarios en las mujeres y las glándulas suprarrenales, a lo largo de la edad adulta (43, 45)

La mayor acción de la testosterona a nivel de tejido es reducir la resorción ósea (46). Sin embargo, gran parte de esta acción es indirecta a través de aromatización de la testosterona a estrógeno (47). La testosterona aumenta la vida de los osteoblastos (48) y osteoclastos (49) que afectan a la apoptosis. La testosterona también tiene un leve efecto sobre la proliferación de osteoblastos (50). Ambos efectos de la testosterona (estimulación de la proliferación) y la inhibición de la apoptosis contribuyen a su acción sobre el aumento de la formación del hueso. Por otra parte, la testosterona también puede diferir de los estrógenos actuando en diferentes etapas de la diferenciación de los osteoblastos. La testosterona y estrógeno pueden afectar a los osteoblastos diferentemente en varias localizaciones esqueléticas. Así, la testosterona aumenta la aposición perióstica de hueso (51), mientras que el estrógeno se opone a este efecto (52). Este efecto diferencial explica, en parte, el esqueleto más grande alcanzado por el varón durante la pubertad. Se necesita más investigación para aclarar los efectos relativos de la testosterona y los estrógenos en las células óseas.

Los estrógenos.

Los estrógenos son hormonas sexuales esteroideas de tipo femenino principalmente, producidos por los ovarios, la placenta durante el embarazo y, en menores cantidades, por las glándulas adrenales. La función de los estrógenos es mantener las características sexuales secundarias y de la integridad ósea de las mujeres. Después de la menopausia, la terapia de remplazo hormonal previene la pérdida ósea de manera significativa (44).

Los estrógenos tienen funciones específicas en los niveles celulares del esqueleto, tejido y órgano. En el nivel de órgano, los estrógenos actúan para conservar la masa ósea. De hecho, las acciones de los estrógenos y las de tensión biomecánica son los principales mecanismos fisiológicos para la conservación de la masa ósea. De hecho, con algunas excepciones, tales como el estado de exceso de corticosteroides, las principales disminuciones en la masa ósea no ocurren a menos que uno de estos dos mecanismos homeostáticos se vean afectados. A nivel del tejido, los estrógenos suprimen el recambio óseo y mantiene equilibradas las tasas de formación y la resorción del tejido óseo (44). A nivel celular, los estrógenos afectan la generación, vida y actividad funcional de los osteoclastos y osteoblastos. Los estrógenos disminuyen la actividad y formación de los osteoclastos y, mediante el aumento de apoptosis, disminuyen la vida útil de los osteoclastos (53, 54). Existe controversia acerca de la acción de los estrógenos en los osteoblastos. Alguna evidencia sugiere que el estrógeno aumenta la formación osteoblástica, diferenciación, proliferación y función, aunque los resultados han variado entre sistemas de diferentes modelos animales (55-58).

Recientemente, dos grupos (44, 53) han demostrado que los estrógenos antagonizan la apoptosis osteoblástica inducida por glucocorticoides y, así, amplía la vida útil de los osteoblastos.

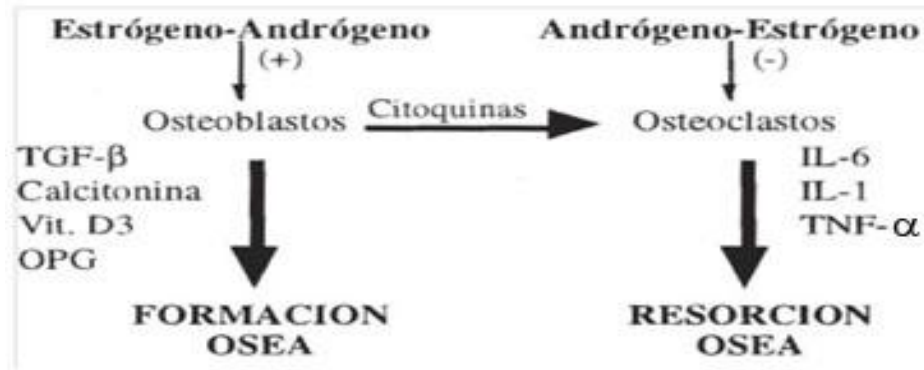


Figura 11. Las hormonas sexuales activan la proliferación de los osteoblastos.

El TGF- β junto con la calcitonina, la 1-25 α -OH Vitamina D3 y la OPG estimulan la formación ósea. La OPG además inhibe la función de los osteoclastos. Los estrógenos y los andrógenos inhiben la producción de IL-6, IL-1 y el TNF- α regulando la osteoclastogénesis y la resorción ósea, (59)

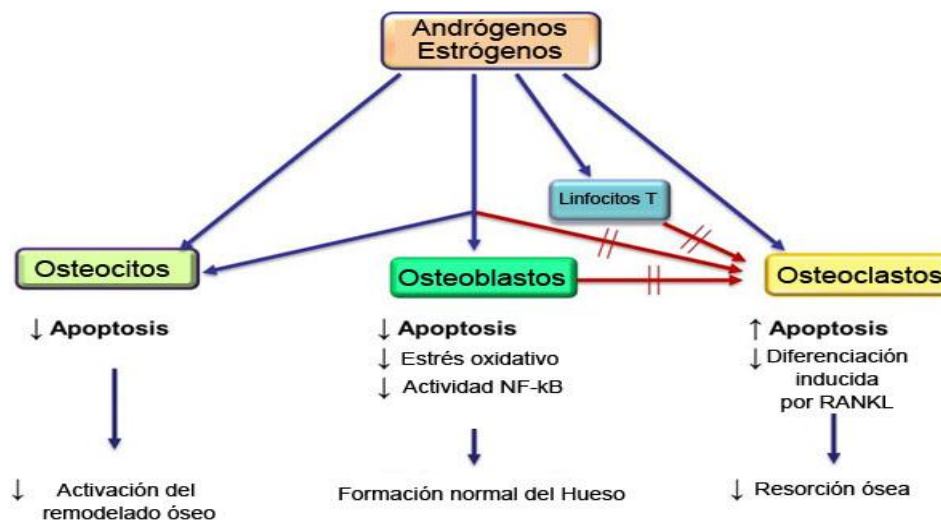


Figura 12. Modelo de regulación de los andrógenos y estrógenos sobre el recambio óseo a través de efectos sobre los osteocitos, osteoblastos, osteoclastos y Linfocitos T.

El principal efecto de los andrógenos y estrógenos es la inhibición del remodelado óseo, probablemente mediada por los osteocitos. Los andrógenos y estrógenos también inhiben la resorción ósea, por efectos directos en los osteoclastos, aunque los efectos de los andrógenos y estrógenos en los osteoblastos, osteocitos y la regulación de los linfocitos T juegan un papel importante en la regulación de los osteoclastos. Deficiencia de los andrógenos y estrógenos están asociados a una brecha entre la resorción ósea y la formación ósea, probablemente debido a la pérdida de los efectos de los andrógenos y estrógenos en la disminución de la apoptosis de los osteoblastos, estrés oxidativo y la actividad osteoblástica de NF- κ B (41).

Los glucocorticoides.

Los glucocorticoides son secretados por la corteza suprarrenal en respuesta a la hormona adrenocorticotrópica (ACTH). Los glucocorticoides son principalmente responsables de la regulación del metabolismo de los carbohidratos, lípidos y de las proteínas, la función cardiovascular y el sistema inmunológico (60, 61). En respuesta al estrés, los niveles de corticosteroides endógenos (cortisol) pueden aumentar hasta diez veces. Los corticosteroides sintéticos para el uso terapéutico como la prednisona y la dexametasona son utilizados principalmente por sus efectos antiinflamatorio e inmunorregulador para tratar tanto las respuestas inflamatorias agudas, asma, así como enfermedades inflamatorias crónicas, como la artritis reumatoide (60,61).

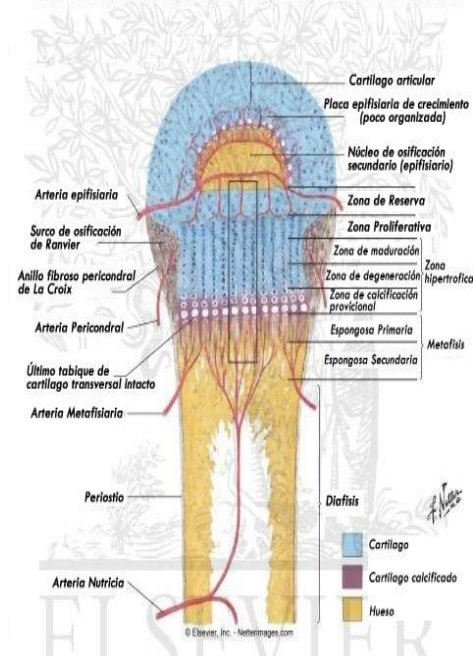
La dexametasona.

La dexametasona (DEX) es una forma sintética de glucocorticoide, puede inducir osteoporosis y fracturas patológicas (62). El recambio óseo normal depende de un equilibrio entre osteoblastos y osteoclastos y se ha sugerido que la DEX puede suprimir la diferenciación de osteoblastos *in vivo* e *in vitro* (63). Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que *in vitro* la DEX aumenta la diferenciación de osteoblastos, la inducción de la actividad de fosfatasa alcalina (FA) y de la mineralización ósea (64-66). En función de estos efectos biológicos, la DEX es utilizada de manera experimental para inducir los procesos de mineralización ósea en los osteoblastos en cultivo (67).

Los péptidos natriuréticos.

El hueso tiene una zona de osificación que posee las placas de crecimiento donde, los osteoclastos y los osteoblastos, del lado de la diáfisis descomponen el cartílago calcificado y lo reemplazan con tejido óseo mineralizado, dicho proceso se muestra en la siguiente Figura 13. (68)

ESTRUCTURA E IRRIGACIÓN SANGUÍNEA DE LA PLACA DE CRECIMIENTO



Organización histológica	
Zona de la placa epifisaria (desde la epífisis a la diáfisis)	Descripción
Zona de reserva	Condrocitos que se encuentran al final de la epífisis
Zona de proliferación	Condrocitos experimentan una rápida mitosis bajo influencia de la hormona del crecimiento
Zona de maduración e hipertrofia	Condrocitos detienen la mitosis e inician la hipertrofia por acumulación de glucógeno, lípidos y fosfatasa alcalina
Zona de calcificación	Condrocitos experimentan apoptosis. Matriz cartilaginosa comienza a calcificarse.
Zona de osificación	Osteoclastos y osteoblastos del lado de la diáfisis descomponen el cartilago calcificado y lo reemplazan con tejido óseo mineralizado.

Figura 13. Estructura e irrigación sanguínea de la placa de crecimiento de huesos largos y organización histológica de la placa de crecimiento. (68).

La diferenciación de los osteoblastos (69) en la zona de osificación está asociada a los niveles intracelulares de los nucleótidos cíclicos como son el AMPc y el GMPc que se regulan de manera recíproca. El GMPc promueve la síntesis de fosfatasa alcalina (FA) y la formación de nódulos mineralizados. El GMPc intracelular es sintetizado por dos clases de guanilil ciclasas: Las guanilil ciclasas solubles citoplásmicas que son activadas por el óxido nítrico (NO-GCs) y las guanilil ciclasas asociadas a membranas plasmáticas, cuya actividad es estimulada por los péptidos natriuréticos (NPR-GC) (70)

Los NPR-GC son activados por los péptidos natriuréticos (PN) como son el péptido natriurético atrial (ANP) y el péptido natriurético del cerebro (BNP) activan la NPR-A y el péptido natriurético tipo C (CNP) que activa la NPR-B produciendo respuestas de vasodilatación, natriuréticas, y diuréticas. Los PN son potentes reguladores del crecimiento celular (71-73).

Hagiwara y col (72) demostraron que el CNP promueve la formación de hueso a través del aumento en la producción de cGMP en osteoblastos de calvaria de rata.

El CNP también estimuló la actividad de la fosfatasa alcalina y la mineralización de los nódulos en cultivos de osteoblastos.

Aunque el NPR-A y el NPR-B sean estructural y funcionalmente muy similares, tienen especificidades por el ligando absolutamente diversas; el NPR-A es sensible a ANP y al BNP, mientras que el NPR-B es altamente específico para el CNP (74). Finalmente otra forma de receptor a los PN es el NPR-C el cual no tiene casi ningún dominio intracelular, y su significado fisiológico en otros procesos a excepción de la remoción “clearance” de los PN, no está bien establecida.

El péptido natriurético tipo C (CNP).

El CNP es el péptido natriurético que está expresado en distintos tejidos como en el hueso, en el cerebro, en el endotelio, en el corazón. El CNP es expresado en osteoblastos y se encuentra en altas concentraciones en condrocitos (75, 76). Este PN no se almacena en gránulos intracelulares. El CNP es el péptido natriurético más conservado desde el punto de vista evolutivo. El proCNP humano contiene 103 aminoácidos, y se ha demostrado que la endoproteasa intracelular (furina) procesa el proCNP a CNP de 53-aminoácidos “in vitro” (Figura 14) (77). Existen dos formas activas de CNP, el CNP-53 el cual es transformado a CNP-22 por una proteasa extracelular desconocida. Aunque los CNP 22 y 53 tienen funciones similares o idénticas (78, 79), su expresión en los tejidos es diferente. El CNP-53 es la forma principal en el cerebro (80), las células endoteliales (81) y en el corazón (82), mientras que el CNP-22 predomina en el plasma humano (81) y en el líquido cefalorraquídeo (83). Las concentraciones normales de CNP en plasma (ambas formas) están en los rangos de femtomoles (81).

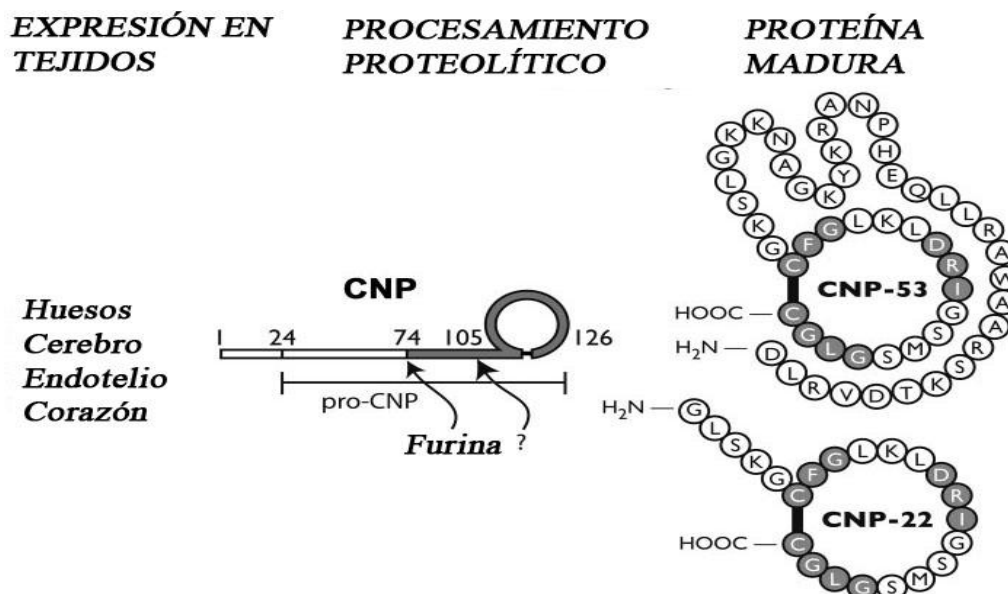


Figura 14. La expresión, procesamiento, y estructura del CNP que se expresa en los tejidos como una pre-pro-hormonas.

Los péptidos son posteriormente procesados de manera proteolítica por enzimas para formar péptidos maduros. El procesamiento de pro-CNP por la endoproteasa furina in vitro resulta en un péptido de 53 aminoácidos. Una enzima desconocida procesa el CNP a un péptido de 22 aminoácidos. De manera similar todos los péptidos natriuréticos maduros contienen 17 residuos conservados en una estructura de anillo formada por un enlace disulfuro que se requiere para su actividad. El enlace disulfuro se muestra en negro, y los residuos conservados dentro del anillo se muestran sombreados. (Tomado y modificado 77)

En humanos, el gen para el CNP está situado entre 2q24 y el terminal de 2q del cromosoma 2 (84, 85). El gen en ratones está localizado en el cromosoma 1 (85). La alteración en el gen murino del CNP (Nppc) da como resultado ratones con tensión arterial normal que muestran un enanismo severo y sufren una muerte prematura como consecuencia del deterioro de la osificación endocondral (Tabla 1) (86).

Tabla 1. Fenotipos de ratones y humanos con mutaciones que inactivan a los genes que codifican para péptidos natriurético y sus receptores (86)

Gen	Fenotipo de ratón "knockout"	Enfermedad en Humanos
ANP	Hipertensión Cardiopatía Hipertrofica	
BNP	Fibrosis ventricular	
CNP	Enanismo	
NPR-A	Hipertensión	

	Fibrosis ventricular Cardiopatía Hipertrófica	
NPR-B	Enanismo Convulsiones Esterilidad en las hembras Disminución del tejido adiposo	Enanismo Displasia acromesomelica tipo Maroteaux (AMDM)
NPR-C	Gigantismo Hipotensión	

Receptor del péptido natriurético tipo C (NPR-B).

El ARNm del receptor del Péptido Natriurético tipo C (NPR-B) se ha encontrado en los siguientes tejidos: pulmonar, cerebral, suprarrenales, riñón, útero y ovario (Tabla 2) (87-89). En estudios de hibridación “in situ” se ha detectado el ARNm de NPR-B en la médula suprarrenal, hipófisis, cerebelo y piel (90). El NPR-B es el receptor del péptido natriurético predominante en el cerebro (91). De manera especial, se encontraron altos niveles de ARNm de NPR-B en el hipotálamo y la neurohipófisis (92). El NPR-B ha sido encontrado en concentraciones relativamente altas en los fibroblastos (Tabla 2) (89, 93-95).

Tabla 2. Expresión de receptor péptido natriurético tejidos y líneas celulares (87, 88, 93-95)

Receptor	Expresión en tejidos	Líneas celulares
NPR-A	Suprarrenal, cerebro, músculo liso vascular, pulmón, riñón, tejido adiposo, corazón.	Células primarias de músculo liso vascular Células primarias mesangiales renales PC-12 Algunas líneas de células 293
NPR-B	Condrocitos, cerebro, pulmón, Músculo liso vascular, útero	Células primarias de músculo liso vascular Músculo liso (A10, A7R5) Fibroblastos (NIH3T3, Balb3T3) Condrocitos (ATDC5)
NPR-C	La mayoría de los tejidos	A10 Células primarias de músculo liso vascular.

El NPR-B tiene la misma topología general como el NPR-A (Figura 15). Pero debido a que no se ha obtenido la forma cristalina del NPR-B, toda su estructura y modelo de activación son deducidos de los estudios con la forma cristalina del NPR-A, con la presencia de enlaces tipo disulfuro del NPR-B (96). La mutación de Asn-24 a Asp resultó en una pérdida de 90% en el enlace del CNP, que es probablemente debido a los inadecuados pliegues o localización del receptor a nivel celular (97,98). El NPR-B es fosforilado en Thr-513, Thr-516, Ser-518, Ser-523 y Ser-526 (99). Igualmente para el NPR-A, cualquier mutación de estos residuos a alanina reduce la

actividad de guanilil ciclasa dependientes del CNP. Múltiples variantes del NPR-B han sido identificadas, incluyendo una especie que carece de actividad enzimática que puede funcionar de manera negativa (100, 101). El orden de activación del NPR-B por péptidos natriuréticos es $CNP \gg ANP \geq BNP$. (102, 103).

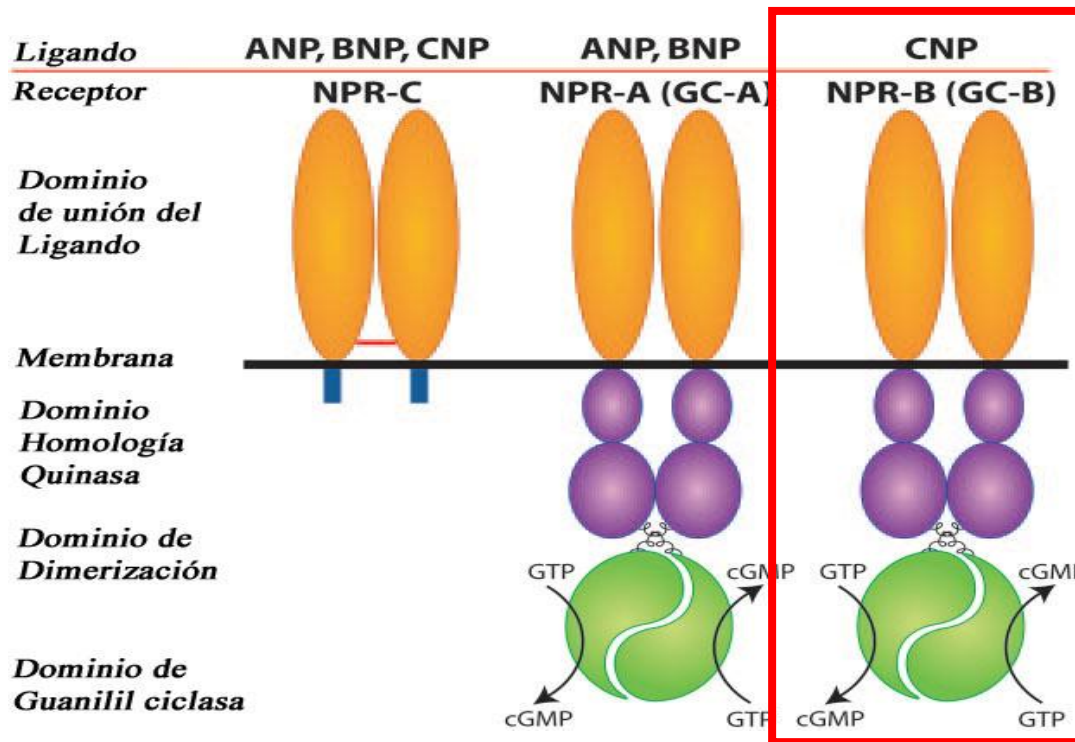


Figura 15. Receptores de péptido natriurético: topología y preferencias por el ligando.

Los péptidos natriuréticos se enlazan a tres proteínas, el NPR-A, NPR-B y NPR-C. El NPR-A y el NPR-B son receptores que contienen guanilil ciclasas asociadas a membranas, presentan un dominio extracelular de unión del ligando, una región hidrofóbica transmembrana y homología quinasa intracelular, y dominios guanilil ciclasa. El dominio catalítico se tiene como hipótesis que forma un dímero en un arreglo de cabeza a la cola y que contiene dos sitios activos. Línea horizontal roja indica un enlace de disulfuro intermoleculares (102,103).

Por otro lado, el NPR-B localizado en las membranas plasmáticas del músculo liso traqueal de bovino presenta una regulación y cinética compleja, es activado por péptidos natriuréticos ($CNP-53 > ANP-28$). Además el NPR-B es regulado por proteínas G heterotriméricas. Es activado por una proteína Gq heterotrimérica (estimulado por mastoparan) e inhibido por una proteína Gi-sensible a cloruro (104).

En modelos de ratones se ha demostrado que existen dos mutaciones asociadas a la pérdida de la función para el NPR-B. La mutación de los exones del 3 al 7, que codifican para la mitad de la cadena hacia el carboxilo terminal del dominio extracelular y del segmento transmembrana del NPR-B, por recombinación homóloga, da como resultando enanismo y hembras estériles (105). Los animales heterocigotos fueron significativamente más pequeños que los animales de tipo “salvaje”. Una mutación espontánea resultante de una transversión de T a G, provoca la sustitución de una leucina altamente conservada en una arginina en el dominio de actividad guanilil ciclasa del NPR-B. También producen enanismo en ratones que contienen dos alelos defectuosos (cn/cn) (106).

Las mutaciones homocigotas hacen que se pierda la función en el NPR-B humano y se han identificado en pacientes con una forma de enanismo que presentan miembros acortados, llamado displasia acromesomelica, tipo Maroteaux (Tabla 1) (107).

La activación del NPR-A y NPR-B.

En el estado basal, el NPR-A es un oligómero (dímeros, trímeros y tetrámeros) altamente ordenado y su actividad de guanilil ciclasa está fuertemente inhibida y el enlace del ligando no conduce a más oligomerización (108-110). El análisis de la estructura cristalina del NPR-A indica que una molécula de ANP unida por dos moléculas de NPR-A provoca una translocación en forma de “rueda de ferry” en los dos dominios juxtamembrana con poco cambio en la distancia entre los dominios (111).

Esta señal de activación mediante un mecanismo desconocido se transmite a través de la membrana plasmática, que inicia una serie de eventos. En primer lugar, se libera la inhibición ejercida por el dominio de homología quinasa. Se ha postulado que el dominio de homología quinasa inhibe al NPR-A, porque receptores que carecen de este dominio son constitutivamente activos (112, 113). De manera secuencial los dominios de guanilil ciclasa se juntan en un arreglo de cabeza a cola para formar dos sitios activos por dímero. Sin embargo, es probable que las dos ciclasas (adenilil ciclasa AC y guanilil ciclasa GC) tengan una estructura similar en el

sitio catalítico porque sorprendentemente pocos aminoácidos se necesitaron para convertir una guanilil ciclasa en una adenilil ciclasa y vice versa (114, 115). En segundo lugar, la afinidad del dominio que une la hormona disminuye, lo que aumenta la velocidad de disociación (116, 117). Por último, los sitios regulatorios de fosforilación en el dominio de homología quinasa son defosforilados, lo que desensibiliza a estos receptores para los PN (Figura 16) (118). Es conocido que, el NPR-A es defosforilado por dos diferentes actividades de fosfatasas en membranas. Una es inhibida por microcistina y no requiere un cofactor metálico para la actividad. La otra requiere magnesio o manganeso para la actividad pero no es inhibida por microcistina (119).

El ANP aumenta la actividad de guanilil ciclasa en membranas crudas en ausencia de ATP (120-123). Sin embargo, al agregar ATP y el AMP-PNP a la mezcla de la reacción se observó un aumento considerable de la actividad de la ciclasa dependiente de ANP (121–123). Estos hallazgos experimentales sustentan la hipótesis que el ATP se une directamente y activa el NPR-A (124–126) y el NPR-B (127). La activación para los receptores de PN se ha propuesto en 2 etapas, así, inicialmente, la unión del PN al dominio extracelular facilita el enlace de ATP en el dominio de homología quinasa (99,128) que finalmente favorece que los dominios catalíticos formen un sitio activo favoreciendo la transformación de GTP en GMPc.

Además se ha observado que en una preparación de membranas obtenidas en la presencia de inhibidores de fosfatasas, el NPR-A o el NPR-B muestran una activación hasta de 200 veces aun en ausencia de ATP (129). Estos datos sugieren que el ATP estabiliza, pero no activa a los receptores de los PN como es el caso del NPR-B.

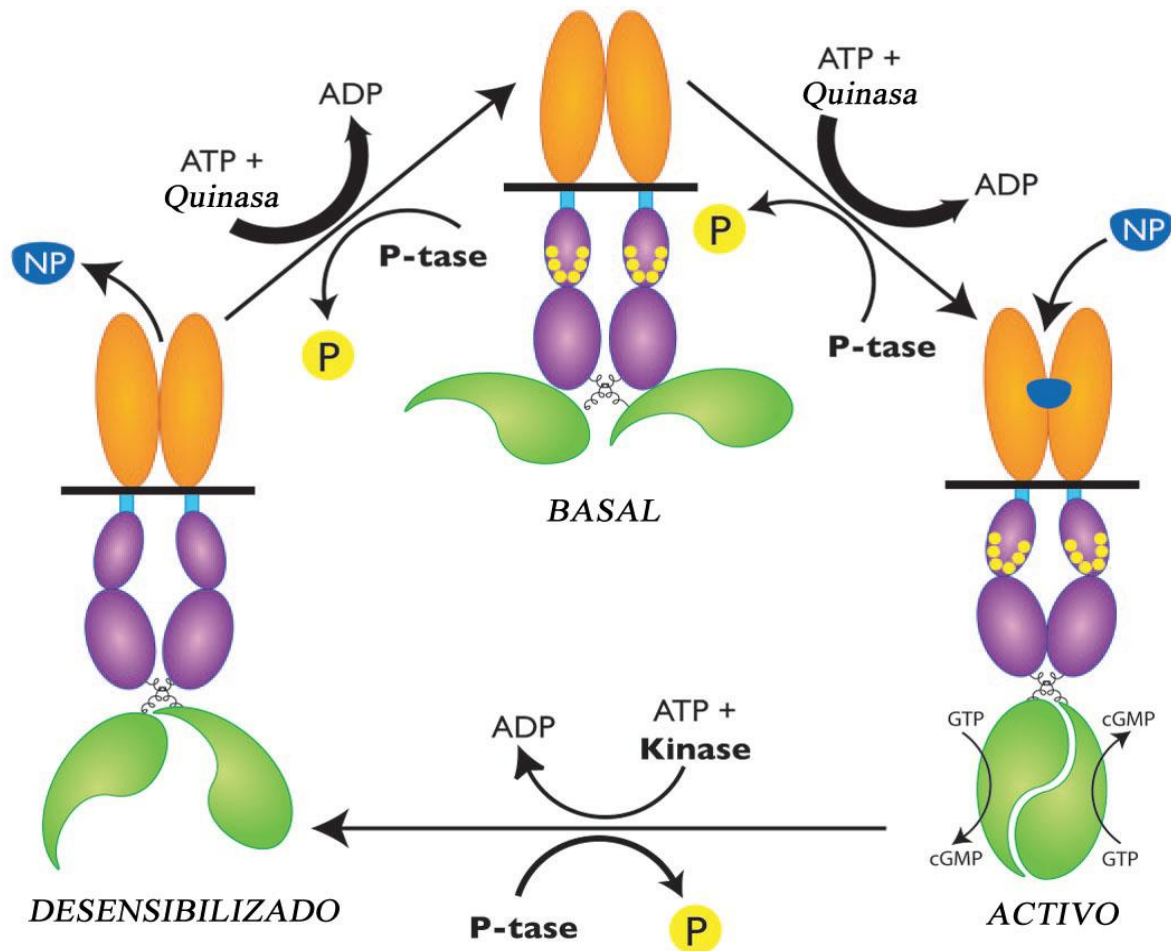


Figura 16. Un modelo hipotético para la activación y desensibilización del NPR-A y NPR-B.

Tres estados del receptor están indicados como “basal”, “activo” y “desensibilizado”. En el estado basal, el NPR-A y el NPR-B son oligómeros ordenados (se muestra aquí como dímeros para mayor simplicidad). En estado basal, ellos están fosforilados en cinco (NPR-B) o en seis sitios conocidos (NPR-A) dentro del dominio de homología quinasa (púrpura). Los fosfatos están indicados por las pequeñas esferas amarillas. Se tiene como hipótesis que la fosforilación “prepara” al receptor para la activación hormonal. La velocidad de fosforilación o desfosforilación se indica por el grosor de las flechas respectivas. El péptido natriurético (NP; azul) se une al receptor altamente fosforilado, en este receptor basal inactivo se induce un cambio conformacional que reúne las regiones juxtamembranas del dominio extracelular. Esta señal de activación se transduce a través de la membrana, lo cual hipotéticamente disminuye la inhibición del dominio homología quinasa en el dominio de guanilil ciclasa (verde). Esto permite que los dominios ciclasa se dimericen. Cada dímero está previsto en contener dos sitios activos. La prolongada exposición al ligando estimula la desfosforilación del receptor, que resulta en una reducida actividad a través de un proceso llamado desensibilización. La liberación del ligando y la refosforilación devuelve la enzima a su estado basal (108-110).

En el caso del tejido óseo, el crecimiento de huesos largos por ser dependiente de CNP requiere la activación de su receptor que es el NPR-B y se activan una serie de procesos que conllevan al crecimiento de dichos huesos largos (Figura 17) (130).

El crecimiento longitudinal del hueso se determina por osificación endocondral en la placa de crecimiento. El CNP, se produce en la placa de crecimiento y actúa localmente como un regulador positivo de la osificación endocondral a través de la acumulación intracelular del GMPc. El aumento de las concentraciones del GMPc activa diferentes mediadores de señalización, tales como las proteínas quinasas dependientes de GMPc, como son las PKGII. En ratones deficientes de la PKG-II (Prkg2 (- / -)) desarrollan un enanismo como resultado de la alteración de la osificación endocondral, lo que implica que la PKG-II asociada a membranas plasmáticas juega un papel crítico en la osificación endocondral mediada por CNP.



Figura 17. Crecimiento de huesos largos dependiente de CNP.

El crecimiento de huesos largos dependiente de CNP que requiere el enlace del CNP, la activación del NPR-B, y el aumento del e GMPc, seguido por la activación de la PKGII y el aumento en la fosforilación dependiente de PKGII en la proliferación de condrocitos hipertróficos. Los sustratos para la PKGII en este proceso no han sido identificados. Un sustrato posible es el factor de diferenciación del condrocito, Sox9. (130)

En resumen, el CNP estimula la síntesis de colágeno y la formación de nódulos de hueso mineralizado. El CNP actúa como un regulador positivo de la formación de hueso por los osteoblastos y se ha observado que la vía de señalización para CNP cambia de NPR-B/GMPc/PKG-II a NPR-C/proteína Gi/PLC con el envejecimiento (131).

Patologías que afectan al tejido óseo.

El conjunto estructural integrado por huesos y cartílagos, el cual es denominado sistema esquelético, puede sufrir ciertas patologías agudas: accidentes, traumatismos y crónicas más frecuentes como son la osteoporosis y una diversidad de osteoartritis, tumores e infecciones crónicas generando artritis séptica hasta llegar a una osteomielitis. Otras enfermedades crónicas de origen iatrogénico como son la osteólisis peri-implante, el aflojamiento aséptico y séptico de los dispositivos o prótesis que se caracterizan por daños en la matriz ósea y alteraciones en las células que la componen, en especial a los osteoblastos. Un resumen del curso temporal y de las células que participan en los diferentes procesos asociados a la reacción de cuerpo extraño presente en la osteólisis peri-implante se puede observar en la Figura 18 (132)

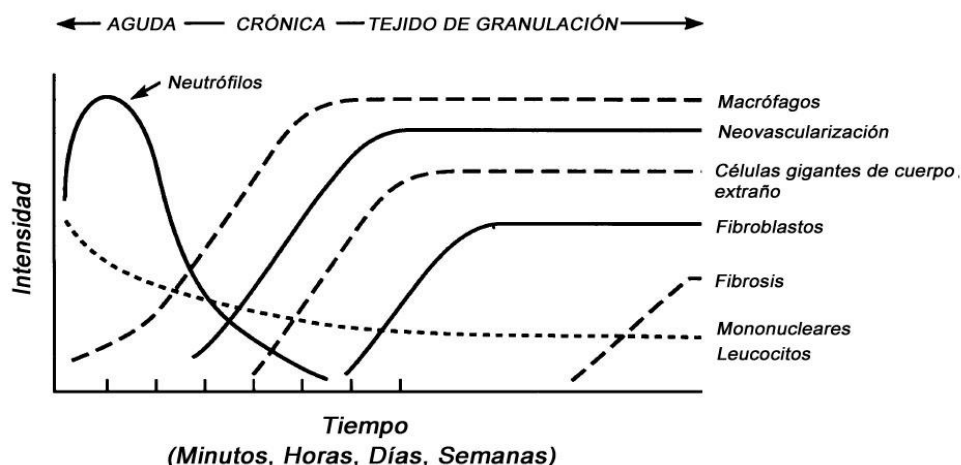


Figura 18. Variación temporal en la respuesta inflamatoria aguda, respuesta inflamatoria crónica, desarrollo de tejido de granulación y reacción de cuerpo extraño con biomateriales implantados.

Las variables de intensidad y tiempo dependen de la extensión de la lesión creada en la implantación y el tamaño, forma, topografía y propiedades químicas y físicas del biomaterial (132).

Las patologías antes mencionadas están asociadas a procesos inflamatorios crónicos donde participan varios tipos de células siendo las más relevantes, el macrófago y el linfocito T como se observa en la Figura 19 (133).

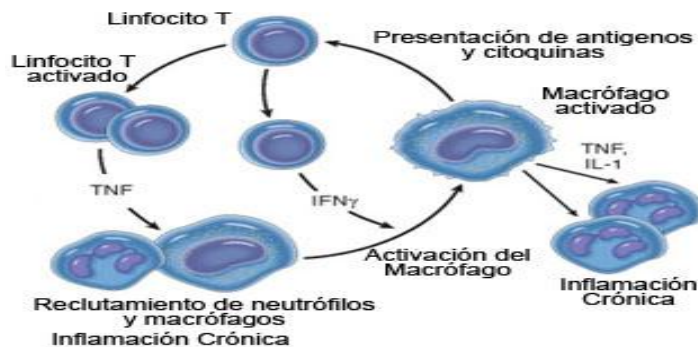


Figura 19. Interacción entre macrófagos y linfocitos de manera que ayuda a estimular a diferentes tipos de células.

Estas células activadas liberan mediadores inflamatorios tales como interferón gamma (IFN γ), interleuquina 1 (IL-1) y factor de necrosis tumoral (TNF). El IFN- γ ayuda a activar los macrófagos así como en los procesos inmunes innatos. La IL-1 tiene un efecto pro inflamatorio. El TNF participa en la regulación de las células inmunológicas. (133)

Estas células producen una gran variedad de citoquinas que pueden afectar la fisiología del osteoblasto e interferir en la producción de matriz ósea, hay que enfatizar que es la única célula capaz de producir material óseo nuevo. Entre estas citoquinas capaces de alterar la diferenciación y la proliferación de los osteoblastos se han evaluado el factor de necrosis tumoral (TNF) y la interleuquina 1 (IL-1) y la interleuquina 6 (IL-6) (134). Estas citoquinas son capaces de actuar sobre los osteoblastos activando un conjunto de cascadas intracelulares que involucran la familia de las Mitogen-activated protein kinases (MAPK) que conducen a la osteoclastogenesis.

Este proceso inflamatorio produce la inhibición de la actividad de osteogénesis, así como la disminución en la mineralización ósea. Por lo anterior ocurre un desequilibrio entre la osteogénesis y la osteólisis, esta última función realizada por los osteoclastos, células que degradan la matriz ósea. Una situación donde los osteoblastos son incapaces de producir matriz ósea, crea un desequilibrio

ya que está severamente afectada la osteogénesis dejando el proceso de osteólisis producida por el osteoclasto sin ningún obstáculo, para degradar la matriz ósea, lo cual afecta de manera significativa al tejido óseo conduciendo a la aparición de patologías que afectan a los pacientes (134).

Entre el conjunto de patologías, es de nuestro interés, aquellas alteraciones en la fisiología de los osteoblastos, asociado a la presencia de productos bacterianos como es el LPS (lipopolisacárido) (135). El LPS proviene de la pared celular de bacterias gram-negativas, el cual es uno de los agentes etiopatogénicos, de origen exógeno, más importante en la alteración de la osteogénesis que se observa en infecciones crónicas por bacterias gram-negativas.

El lipopolisacárido (LPS).

El LPS o endotoxina bacteriana, es el componente principal de la membrana externa de las bacterias gram-negativas como se observa en la Figura 20 (135, 136).

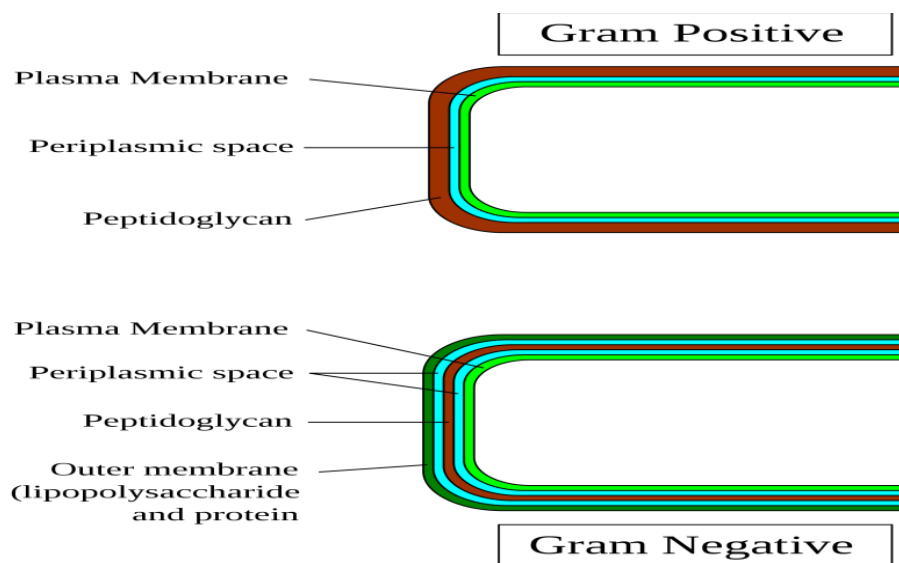


Figura 20. Esquema de organización de las membranas de las bacterias gram-negativas y gram-positivas.

La organización desde el interior de las gram-positivas es la presencia de membrana plasmática, espacio periplásmico y en la superficie peptidoglicano. Las gram-negativas presentan en su exterior una membrana externa que contiene los lipopolisacáridos (136)

Los LPS son glicolípidos complejos que están formados de tres porciones como se puede observar en la Figura 21. La porción hidrofóbica lípida proximal (lípid A) que ancla el LPS a la membrana externa bacteriana. La porción hidrofílica distal de polisacárido (antígeno-O) que resalta en el medio circundante y el oligosacárido de la base que ensambla el lípid A y las estructuras del antígeno-O. Mientras que las estructuras del antígeno-O muestran considerable diversidad en diferentes bacterias Gram-negativas, el lípid A es altamente conservado y se compone de un esqueleto de N-acetilglucosamina que contiene ácidos grasos de cadena larga unidos mediante uniones éster y amida. El lípid A se reconoce por ser esencial en la estructura de los LPS y sus interacciones con el sistema inmune innato (137), y los LPS son inactivados mediante tratamientos que eliminan las cadenas laterales de ácidos grasos del lípid A.

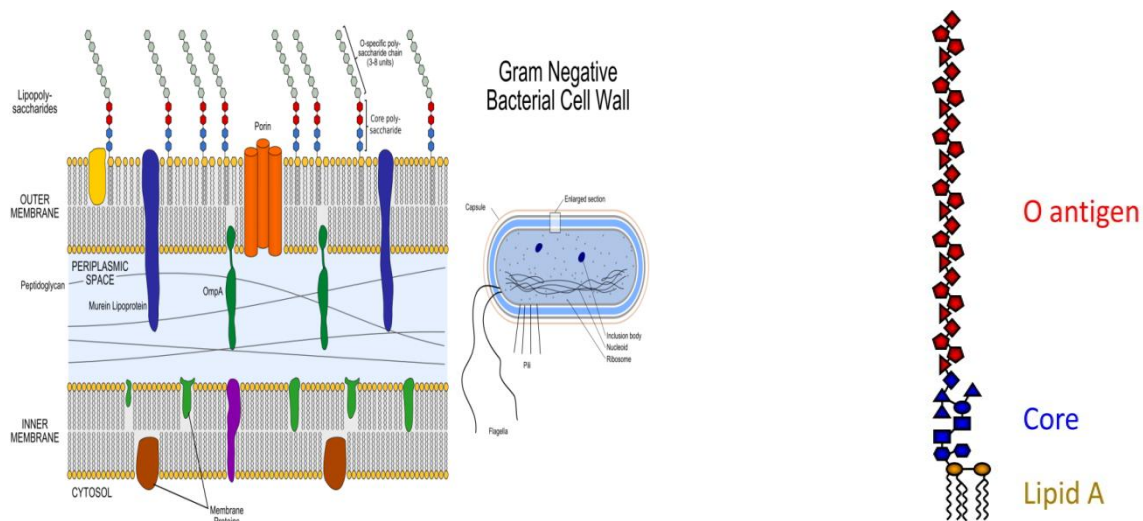


Figura 21. Esquema de organización de las membranas de las bacterias gram-negativas y la estructura del Lipopolisacárido (LPS).

A) Esquema de una bacteria gran-negativa. B) Un esquema de la pared bacteriana donde está dividida en membrana interna que rodea el citoplasma bacteriano, luego el espacio periplásmico donde está presente los peptidoglicanos y la membrana externa donde están localizados los LPS. C.- Modelo de la estructura del LPS: Lípid A, el core y el antígeno O (136).

En la presencia de bacterias gram-negativas, la activación de las defensas inmunológicas en el organismo requieren el reconocimiento del LPS por los mecanismos que implican una proteína de fase aguda del plasma llamada proteína

de unión del LPS (LPS-binding protein-LBP) y la proteína CD14 anclada a la membrana plasmática de células de mamíferos mediante una cola de glicosilfosfatidilinositol (138). La LBP sirve como opsonina y el CD14 como un receptor para los complejos de LPS y de la LBP. Varias líneas de evidencias indican que la función del CD14 es exclusivamente como proteína de unión al ligando (LPS) (138).

Así, recientemente se han aclarado los mecanismos de acción del LPS a través de la membrana plasmática mediados por la activación de las vías de señalización celular dependiente del LPS interactuando con la LBP y el CD14 que a su vez actúan sobre los receptores “Toll-like” (TLR). La estimulación del TLR-4, conduce a la activación de las MAPK como se puede observar en la Figura 24 (139). El LPS es un mitógeno y activador del sistema inmune y es activo a concentraciones menores de 1nM (138).

Los receptores Toll-like (TLR)

Los receptores “Toll-like” (TLR) juegan un papel importante en la defensa inmune innata contra las infecciones al ser receptores para moléculas patógenas.

Estos receptores pueden reconocer patrones comunes en un gran número de moléculas microbianas y se refieren a veces como receptores de reconocimiento de patrones (Pattern recognition receptors) (140, 141). Aunque el reconocimiento de patrones es intrínsecamente menos específico, debe ser capaz de distinguir las moléculas patógenas de las moléculas propias del huésped, que a menudo tienen similitud estructural. Un error en esta discriminación de reconocer lo propio de lo no propio puede ser fatal para el huésped y conducir a la aparición de una enfermedad autoinmune.

Se han descrito 10 TLR en los seres humanos y 12 en el ratón, los cuales están implicados en el reconocimiento de múltiples grupos de moléculas microbianas, que generalmente no se encuentran en los seres humanos (141, 142). Los TLR-4 forma heterodímeros con la región MD-2 (Lymphocyte Antigen 96) de

dicho receptor que se activa por la presencia de LPS de bacterias Gram-negativas (Figura 22).

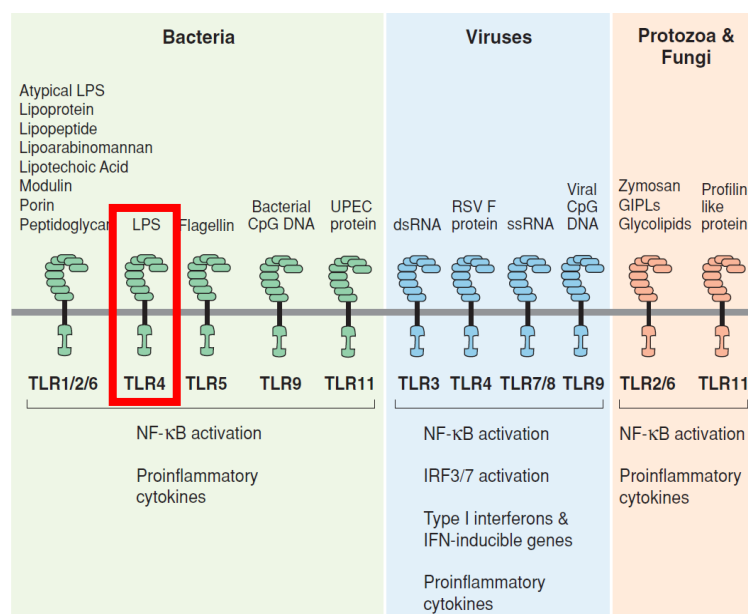


Figura 22. Especificidad del ligando por su receptor. Los receptores toll reconocen una diversidad de patrones moleculares asociados a patógenos, tales como: bacterias, virus, protozoarios y hongos. (142)

Los TLR son componentes cruciales de nuestra defensa contra la infección por patógenos. Al mismo tiempo la desregulación de la actividad del TLR está involucrada en síntomas infecciosos y no infecciosos y a veces puede tener consecuencias no deseadas. Debido a esto, los TLR han sido objetivos importantes de la terapéutica inmune (143). Los antagonistas selectivos de los TLR-4 se han desarrollado como drogas para el tratamiento de la sepsis (144, 145). Recientemente un agonista débil del TLR4 fue aprobado como un tratamiento adyuvante de las vacunas (146-149).

El receptor toll-like 4 (TLR-4)

El receptor TLR-4 forma un heterodimero con MD-2 resultando en un complejo TLR-4-MD-2 responsable en el reconocimiento del LPS (150). El MD-2 es una glicoproteína de 14 kDa y se une al TLR-4 para formar el complejo TLR-4-MD-2 esta unión, es mediada en general por interacciones hidrofílicas, como enlaces de hidrogeno e interacciones de cargas (151-154) como se ilustra en la Figura 23.

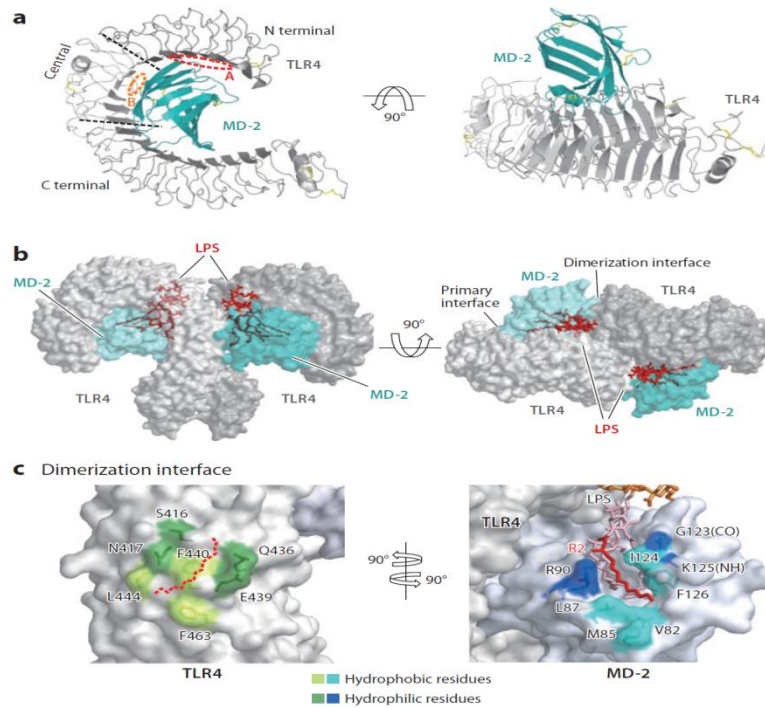


Figura 23. Estructura Cristalina del TLR-4.

A.- Estructura del TLR-4 y MD2. B.- Estructura del complejo TLR-4-MD2-LPS. C.- Interacción del LPS con el TLR-4 y MD2. Kang JY, Lee JO. Annu Rev Biochem. 2011. Jun 7;80: 917-41 (154).

La activación del TLR-4 por el LPS

Es de nuestro interés, el receptor TLR-4 que se localiza en la superficie celular de los osteoblastos, el cual es estimulado por el LPS para la producción y liberación de IL-1, IL-6, prostaglandina (PGE_2) y RANKL (155-158).

El LPS estimula al receptor TLR-4 en la superficie celular en colaboración con otras moléculas, tales como: CD14, MD-2, y la proteína LBP (159-161). Las señales descendentes del TLR-4 es mediada por moléculas adaptadoras incluyendo el factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88), la proteína adaptadora del receptor toll-receptor de interleucina (TIRAP: toll-interleucine receptor adapter protein) / proteína adaptadora parecida al MyD88 (Mal), el “toll-receptor” de IL-1 que contiene la proteína inductora de interferón- β (TRIF) y la molécula adaptadora relacionada a TRIF (TRAM) (162-165).

Estas señales activan el transporte nuclear del factor nuclear-kappa β (NF- $\kappa\beta$) y de las cascadas de las proteínas quinasas MAPK: quinasas que son reguladas por señales extracelulares (ERKs), quinasas como son c-Jun N-terminal (JNKs) y p38

(166-169). Además, se ha demostrado en los osteoblastos que es indispensable una serina-treonina quinasa, Cot/Tpl2, para la activación de las ERKs inducida por LPS (170-172). La activación de Cot/Tpl2 en los osteoblastos regula la producción de diversas citoquinas, tales como; el RANKL, en respuesta a LPS (171-173). En la figura 24 se muestra en forma esquemática el modelo propuesto de la señalización del LPS

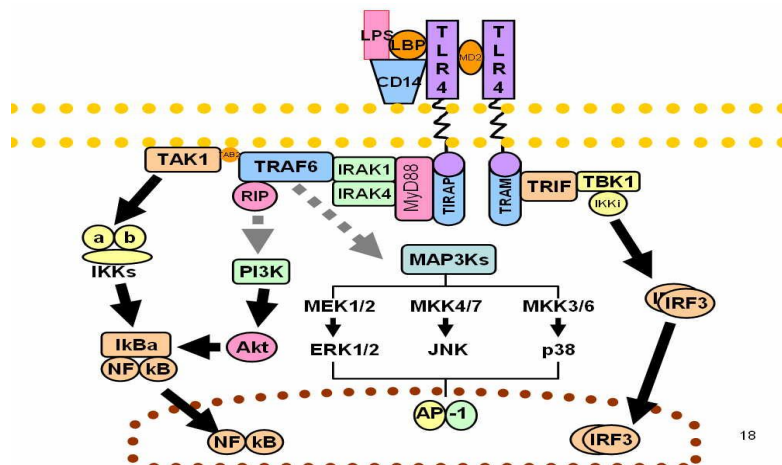


Figura 24. Modelo de la señalización del LPS.

Vía de activación de las MAPK a través de la activación del TLR-4 mediante el LPS. (139).

La diferenciación de los osteoblastos se ve afectada al estar presente el LPS proveniente de la pared celular de las bacterias gram-negativas y se ha identificado como el factor etiopatogénico, más importante en la destrucción ósea presente en enfermedades como la artritis inflamatoria (174) y la periodontitis (175). Como se mencionó anteriormente, el LPS estimula al receptor TLR-4 en la superficie celular de los osteoblastos para la producción y liberación de IL-1, IL-6, PGE₂ y RANKL (155-158), todos inducen a la maduración o la activación de osteoclastos. Estudios recientes han demostrado que la activación del TLR-4 mediante el LPS en osteoblastos es dependiente del Myd-88 teniendo un efecto inhibitorio de la diferenciación (176).

Numerosos modelos “in vitro” han demostrado que las partículas de desgaste de los implantes ortopédicos, son generadas en la superficie de la articulación y

removidas por la fagocitosis de los macrófagos. Estos últimos son estimulados para la liberación de productos pro-inflamatorios capaces de inducir la resorción ósea local (132,134). En este sentido, Cao y col (135) utilizando los monocitos/macrófagos expuestos a partículas contaminadas con LPS encontraron un aumento significativo de la actividad pro-inflamatoria. Ellos reportaron incrementos marcados en los niveles del TNF- α , IL-1 α , y de la IL-1 β . Además, demostraron que el LPS se une a la superficie de las partículas de composición diversa y que el LPS unido a dichas partículas es biológicamente activo. Tratamientos químicos drásticos para inactivar el LPS asociado a partículas destruyen toda la actividad biológica del LPS. Es probable que la presencia de la endotoxina asociada a partículas en la interface hueso-implante “in vivo” podría aumentar de manera significativa el efecto adverso de estas partículas de desgaste sobre la resorción ósea local.

En resumen, en relación a la pérdida de masa ósea, el LPS estimula a los osteoclastos que activan la resorción ósea (176), a su vez estudios recientes han sugerido que la diferenciación osteogénica de los osteoblastos es inhibida por esta endotoxina conduciendo a la falta de producción de matriz ósea. Ambos mecanismos actúan de manera sinérgica para lograr la pérdida de masa ósea inducida por el LPS (177, 178).

En la formación de masa ósea, se ha descrito que el CNP estimula la generación de nódulos de hueso mineralizado. Así, Inoue y col (69) han demostrado que la diferenciación de los osteoblastos en la zona de osificación está asociada a los niveles intracelulares de los nucleótidos cíclicos como son el AMPc y el GMPc que se regulan de manera recíproca. El GMPc promueve la síntesis de fosfatasa alcalina y la formación de nódulos mineralizados.

Miyazawa y col (130) han demostrado que el CNP producido en la placa de crecimiento actúa localmente como un regulador positivo de la osificación endocondral a través de la acumulación intracelular del GMPc. También, Hagiwara y col (72) demostraron que el CNP promueve la formación de hueso a través del aumento en la producción de cGMP en osteoblastos de calvaria de rata. Además, el CNP estimuló la actividad de la fosfatasa alcalina y la mineralización de los nódulos por las células cultivadas. Todas las evidencias anteriores sustentan el hecho que el

CNP actúa como un regulador positivo de la formación de hueso por los osteoblastos mediante la activación de la guanilil ciclasa asociada a membranas plasmáticas (NPR-B) (70).

Uno de los problemas presentes en las prótesis es el aflojamiento aséptico de los implantes utilizados en la cirugía traumatológica, el cual está asociado a la osteólisis y posterior alteración de la prótesis y pérdida de dicho implante. Esta osteólisis es el resultado de una actividad osteoclástica aumentada y se propone que existe una disminución de la actividad de los osteoblastos en el sitio de la lesión. El CNP estimula la actividad osteoblastica y hasta la fecha no se ha reportado, cual es el comportamiento de los osteoblastos en cultivo expuestos de manera simultánea al CNP y al LPS. En esta Tesis Doctoral se procedió de manera original a estudiar el efecto del CNP sobre la proliferación de osteoblastos de ratas neonatales en cultivo en presencia del LPS, como una manera de aproximación a los mecanismos moleculares y celulares asociados a infecciones bacterianas donde esté presente el LPS o la existencia del mismo, en ausencia de bacterias como es el caso de los aflojamientos asépticos de los implantes utilizados en traumatología. Esto último justificó este estudio experimental para entender los mecanismos fisiopatológicos asociados a dichas patologías óseas.

OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar el efecto del péptido natriurético Tipo C (CNP) sobre los osteoblastos de rata en presencia del Lipopolisácarido (LPS).

Objetivos específicos

- 1.- Establecer las condiciones de aislamiento y cultivo primario de osteoblastos a partir de calvaria de ratas Sprague Dawley.
- 2.- Caracterizar el fenotipo de la población celular de los osteoblastos en cultivo mediante la tinción de Hematoxilina/eosina y rojo de alizarina.
- 3.- Estudiar la proliferación basal de los osteoblastos en cultivo durante 24, 48 y 72 horas y en respuesta al SFB, la IL6, el TNF α , el CNP y al LPS.
- 4.- Determinar la actividad de la fosfatasa alcalina en los osteoblastos en cultivo durante 24, 48 y 72 horas y en presencia del SFB, la IL-6, el TNF- α , el CNP y el LPS.
- 5.- Determinar cuantitativamente el proceso de osificación "in vitro" mediante la determinación de hidroxapatita utilizando técnicas espectrofotométricas en los osteoblastos en cultivo durante 24, 48 y 72 horas en respuesta al SFB, la IL-6, el TNF α , el CNP y el LPS.
- 6.- Determinar la actividad del NPR-B (receptor del CNP) presente en los osteoblastos en cultivo, mediante la cuantificación del GMPc en distintas condiciones experimentales.
- 7.- Estudiar las interacciones entre el CNP y el LPS sobre los diversos parámetros vinculados a la actividad osteoblástica como son la proliferación celular, la actividad de la fosfatasa alcalina, la actividad de la NPR-GC y el proceso de osificación "in vitro".

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

- Ratones neonatas Sprague Dawley obtenidas del Bioterio del IME.
- Pentotal sódico: Tiopental sódico 0,5% Abbott.
- Suero fetal de bovino. Sigma Cat. F6178
- Medio de cultivo: DMEM. Sigma. Cat.D5648
- Lipopolisacarido. LPS Serotipo O29:36. Sigma. Cat. L8274
- Péptido natriurético tipo C: CNP. Sigma. Cat.N8768
- Azul tripano: Azul tripano al 0,4% .Sigma Cat.T8154
- Solución de Antibióticos y antimicóticos estabilizado: Solución (100X). Sigma Cat.A5955
- Solución de Hanks: Sigma Cat. H9269
- Solución de L-Glutamina 200mM: Sigma Cat.G7513
- Placas de cultivo de 96 pozos, polipropileno, estériles, fondo plano. NUNC
- Placas de cultivo de 24 pozos, polipropileno, estériles, fondo plano. NUNC
- Cápsulas de Petri, poliestireno, estériles de 5 ml, para cultivo . FALCON
- Tubos cónicos de 50 ml y de 15 ml graduados, estériles. FALCON.
- Pipetas de 1, 2, 5 y 10 ml, graduadas desechables, estériles. FALCON
- Pipetas Pasteur de vidrio estéril
- Tubos de vidrio de 5 y 3 ml estériles.
- Láminas portaobjeto estériles
- Filtros estériles, de tamaño de poro 22 μ m desechables para inyectoras de 5, 10 y 20 ml.
- Filtros de rejilla metálica para retención de agregados celulares (70 mesh)

El aislamiento y establecimiento de las condiciones óptimas de los cultivos celulares de osteoblastos.

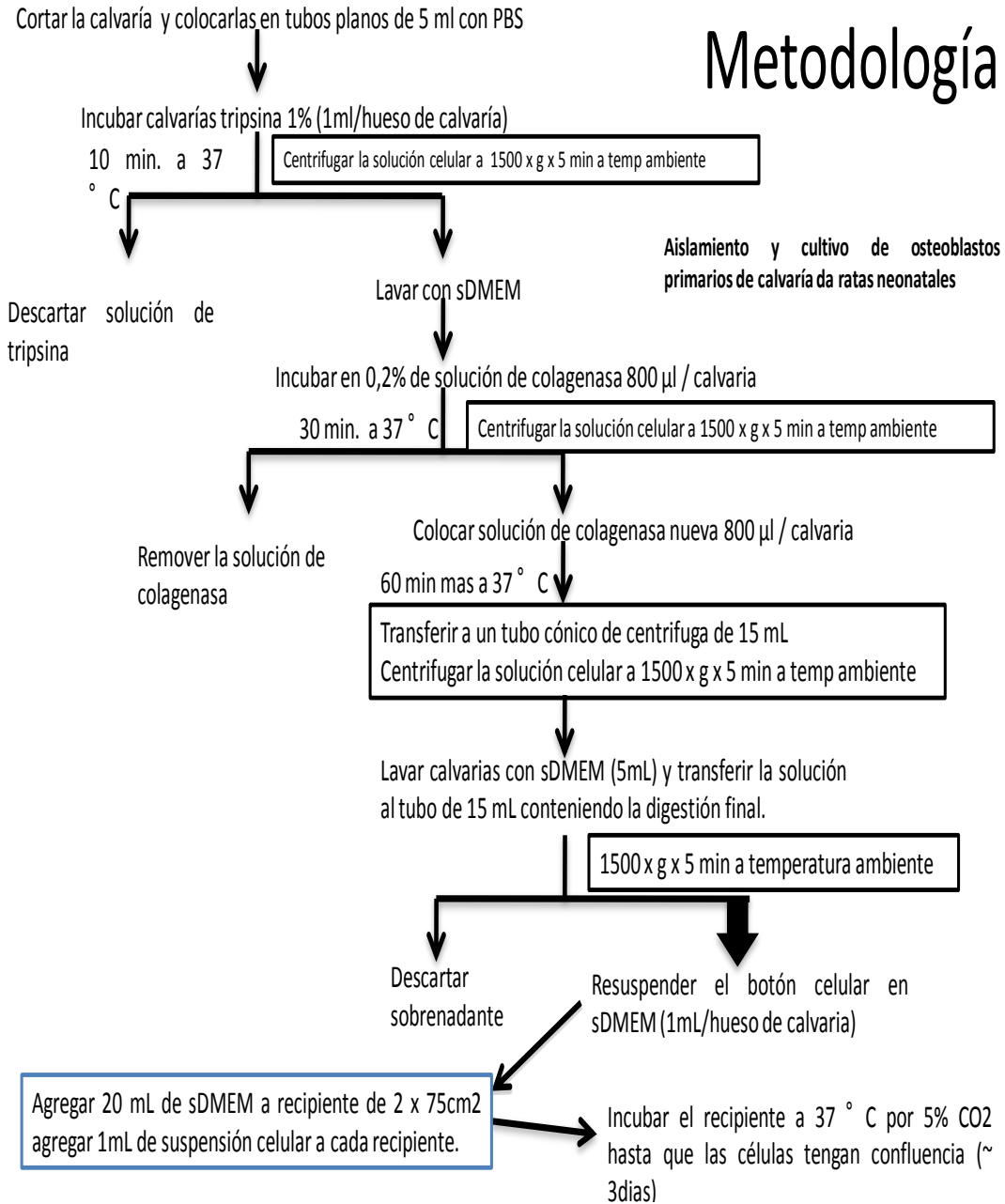
Los osteoblastos fueron aislados a partir de calvaria de ratas neonatas siguiendo la metodología descrita por Isabel R y col (179). Brevemente, los osteoblastos fueron aislados a partir de la calvaria de 8 ratas Sprague-Dawley del Bioterio del Instituto de Medicina Experimental (IME) de 2-3 días de nacidas. Las calvarias fueron diseccionadas bajo condiciones asépticas y limpiadas de los tejidos blandos circundantes. Luego se realizaron 3 lavados consecutivos con PBS 1X, y se eliminó el periostio. Las calvarias fueron cortadas en trozos de 1 mm² aproximadamente.

Para establecer las condiciones óptimas de los cultivos celulares de osteoblastos, todo el proceso fue realizado a temperatura ambiente y las calvarias fueron incubadas en solución de digestión, que contiene: DMEM tripsina 1%, (1ml por hueso de calvaria) durante 10 min. Posteriormente fueron centrifugadas 1500x g x 5 min. El sobrenadante resultante de la primera extracción fue descartado y luego se le agregó DMEMs para detener la acción de la tripsina incubando luego en una solución de colagenasa 0,2% (aproximadamente 800µl por hueso de calvaria) por 30 min. Posteriormente se centrifugó 1500 x g x 5 min y la solución conteniendo colagenasa fue descartada y se agregó una nueva solución de colagenasa, por 60 min, posteriormente se centrifugó a 1500 x g x 5 min. El sedimento celular fue re-suspendido en 5 ml de DMEMs y centrifugado a 1500 x g x 5 min, el botón celular fue re-suspendido en DMEMs (1ml) por calvaria.

A la suspensión celular (1ml) se le agregó 20 ml de DMEMs y luego fue sembrado en un recipiente T-75 cm². Las células fueron mantenidas a 37 °C en atmósfera húmeda y 5% CO₂. El medio fue cambiado a las 24 horas de cultivo, posteriormente se realizaron cambios interdiarios hasta completar una confluencia de 90% al 95% aproximadamente. Una vez confluyente, el cultivo celular se realizó pasajes logrando una homogeneidad celular a partir del tercer pasaje.

A continuación se muestra el esquema 1 que resume el procedimiento descrito.

Esquema 1. Aislamiento y cultivo de osteoblastos primarios de calvarias de ratas neonatales Sprague Dawley



Esquema 2. Protocolo de formación de hueso de osteoblastos en cultivos de calvarias de ratas neonatales Sprague Dawley.

Una vez que las células en el frasco de 75 cm² han alcanzado confluencia (~ 3 días)
quitar el sDMEM y lavar con PBS. Añadir tripsina 1% (2 ml/frasco)

10 min. a 37 °C



Desactivar tripsina con 10 ml de sDMEM; transferir
suspensión celular a un tubo de centrifuga de 15 ml.

1500 x g x 5 min a temperatura ambiente

Descartar
sobrenadante

Resuspender el botón celular en
sDMEM (1mL/hueso de calvaria)



Hacer un Pool de las suspensiones celulares



Realizar un recuento de células mediante un
hemacitometro. Sembrar las células en placas de 24 pozos a
una densidad de $2,5 \times 10^4$ células/pozo con **osDMEM**



Los cultivos normalmente tienen "trabéculas" mineralizadas desarrollándose al 14^{to} día



Tinción celular

Metodología

Protocolo formación de hueso

Contaje celular empleando Hemocitómetro y determinación de la viabilidad celular utilizando Azul de tripano al 0,4%.

El azul de tripano es una coloración recomendada para estimar con precisión la proporción de células viables en una población celular. La reactividad de este colorante está basada en que el cromóforo está cargado negativamente y no entra a la célula a menos que la integridad de la membrana plasmática se pierda, por lo tanto, las células vivas o viables no captan el colorante y las células muertas (no viables) sí lo captan y se tiñen de color azul.

La viabilidad celular fue determinada mediante el método de exclusión de azul de tripano al 0,4% realizándose de la siguiente manera:

1. El hemocitómetro se limpia con etanol al 70%.
2. Se determina la viabilidad en cada tubo agregando: 50 μ L de azul tripano al 0,4%, 30 μ L de solución de Hanks y 20 μ L de células recientemente preparadas.
3. Luego se toma 20 μ l de cada tubo y se procede a transferir al hemocitómetro permitiendo que la suspensión se esparza de manera homogénea por todo el hemocitometro (cámara de Neubauer) (180, 181).
4. El conteo celular se realiza de los campos usando el microscopio en fase 3 con objetivo 40x. El campo de visión en uno de los cuatro cuadrantes, los cuales presentan a su vez una subdivisión de 16 cuadrados pequeños. En este caso se iniciará el conteo utilizando el cuadrante superior derecho (1mm) y el cuadrante inferior izquierdo (1mm), se realizará el conteo de dos cuadrantes opuestos de manera diagonal y se obtendrá un promedio del número de células. Se realizará el conteo como se observa en el Diagrama 1.

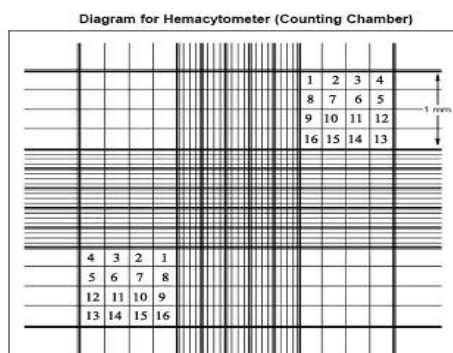


Diagrama 1. Hemocitómetro (cámara de Neubauer) para el conteo celular.

5. Las células fueron contadas dentro de esta área de 1 mm. Se cuentan las células que estén en las líneas superiores y en la línea izquierda de cada cuadrado, pero no las que estén en las líneas inferiores y derechas. Esto es para evitar que las células sean contadas dos veces. Para la exclusión del azul tripano, se contarán las células no marcadas (viables) y las células marcadas por azul (no viables o muertas) por separado y se calcula un promedio.
6. Para obtener el conteo total de las células tanto viables como no viables, se realizan los cálculos de número de células y el de viabilidad.
7. El número de células se calculará de la manera siguiente:

Se trabajó con un factor de dilución de 1:5

Se realizó el cálculo de la viabilidad celular, el número total de células viables es igual a la concentración de células viables multiplicado por el factor de dilución.

Contaje promedio de los dos cuadrados $\times 5 \times 10^4$ = Número de células en millones por ml = R

Después este resultado es multiplicado por el volumen final teniendo como resultado
 Total de células = R $\times$ 4 ml -----> Cantidad de células en el Volumen final

Cálculo de la viabilidad celular (180, 181):

$$\% \text{ viabilidad celular} = \frac{\text{total de células viables (no marcadas)}}{\text{Total de células (marcadas + no marcadas)}} \times 100$$

El ensayo no radioactivo de proliferación celular basado en sales de tetrazolio: MTS-PMS.

La proliferación de los osteoblastos se evaluó mediante la siembra de 1×10^4 células por cada pozo en placas de 96 pozos, con 200 μ L de medio suplementado (DMEM, SFB 20%, P/S 2%, L-Glu 1%) durante 24 hr. Transcurrido este tiempo, se procedió a retirar el medio completo y se le añadieron 200 μ L/pozo de DMEM sin SFB para sincronizar el ciclo celular en la fase G₀/G₁. A las 24 hr se retira el medio y se añaden 200 μ L/pozo de las soluciones conteniendo los reactivos. Para los experimentos a realizarse con los osteoblastos provenientes de ratas entre los

pasajes 3 a 5. a las 24, 48 y 72 horas, de acuerdo al caso, se realizaron las mediciones mediante un ensayo de proliferación no radioactivo, utilizando CellTiter 96[®] AQueous (Promega[®], USA). Al momento de la medición, se retira el medio de cada pozo, y se colocan 100 µL/pozo de medio. Posteriormente, se colocan 10µL de la solución MTS-PMS en cada pozo y se mantienen las placas en incubación húmeda a 37 °C y 5% de CO₂ por 90 min, luego de lo cual son retiradas las placas de la incubadora, protegidas de la luz y se procede a medir la densidad óptica en el lector de ELISA a 492 nm (182, 183). Este ensayo de proliferación celular se basa en que el MTS es convertido en un producto formazán soluble, mediante las deshidrogenasas mitocondriales y citosólicas. La conversión ocurre por la producción de equivalentes reductores como el NADH o el NADPH por parte del metabolismo de las células viables. Estos compuestos reductores ceden sus electrones a un reactivo intermediario de la transferencia de electrones (PMS) que puede reducir a la sal de tetrazolio (MTS) y convertirlo en un producto formazán soluble en el medio de cultivo, cuya producción es directamente proporcional al número de células viables cultivadas, ya que las células muertas pierden rápidamente su capacidad de reducir los productos tetrazolio (182-184).

La determinación enzimática para la fosfatasa alcalina en osteoblastos de rata.

El ensayo se fundamenta en la hidrólisis del p-nitrofenilfosfato, un sustrato sintético, que es hidrolizado por la enzima fosfatasa en medio alcalino (pH 9,4), lo cual se define como actividad de fosfatasa alcalina (FA) (185, 186).

Reactivos:

1.- Amortiguador de ensayo: Glicina-NaOH 1 N pH 9,4, p-nitrofenilfosfato(p-NPP) 0,1 M, MgCl₂ 0,1 M

2.- Preparación del extracto celular para medir la actividad de la FA

El uso del detergente no iónico (TRITON X-100) es para producir lisis de las células y liberar la FA intracelular. La actividad de FA es estable en dichas condiciones de extracción.

Solución de extracción (5X concentrada).

Concentración final: 100 mM Tris-HCl pH 7,5, MgCl₂ 2,5 mM y 0,5 % Triton X-100

La preparación del extracto y el ensayo de la FA (2 opciones):

1.- Células adheridas a las placas de 96 pozos.

El medio de incubación fue removido y se lavó con PBS. En cada pozo se añadió 10 µL de la solución de extracción. Dejo por 5 min a temperatura ambiente y se diluyeron con 40 µL de agua hasta 50 µL agitando suavemente. Luego se añadió 125 µL del Buffer de ensayo conteniendo Glicina-NaOH, 2mM MgCl₂, 5mM p-NPP. La reacción se detuvo añadiendo 125 µL de 1 N NaOH. Posteriormente, se procedió a leer a 405 en lector ELISA (Coeff extinción molar: 18.000 M⁻¹cm⁻¹). La actividad enzimática se expresó en actividad específica = nmoles p-NPP/min/mg de proteínas.

2.- Células sedimentadas.

El botón celular fue obtenido después de remover el medio y se re suspendió con solución de Hanks. Luego se centrifugó a 500xg x10 min. El botón celular se dispersó añadiendo 50 µL de la solución de extracción por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se diluyó con 450 µL de agua hasta 500 µL. y transferidos a tubos Eppendorf con tapas. Estos tubos se agitaron suavemente y se centrifugaron a 2000xg x 10 min, el sobrenadante fue separado y conservado en frío.

En placas de 96 pozos para lector de ELISA, se tomaron 50 µL del extracto anterior y se les añadió 125 µL del Buffer de ensayo conteniendo Glicina-NaOH, 2mM MgCl₂, 5mM p-NPP. La reacción se detuvo añadiendo 125 µL de 1 N NaOH. Luego se procedió a leer a 405nm en lector ELISA (187).

La determinación de las proteínas celulares de osteoblastos según el método de Lowry modificado por Bensadoun & Weinstein.

El método de Lowry (188) se basa en la capacidad de los aminoácidos aromáticos de las proteínas (fenilalanina, tirosina, triptofano) de reaccionar con el reactivo de Folin-Ciocalteu. Además, por la capacidad del complejo Cu²⁺/Tartrato de reaccionar con los enlaces peptídicos de las proteínas.

La modificación de Bensadoun y Weinstein (1989) se basa en el uso de la capacidad del Deoxicolato de formar complejos con las proteínas, los cuales son precipitados en medio ácido ATC (Ácido tricloroacético), que permite separar las proteínas del medio donde se suspenden las células como es el Hanks u otro medio que interfiera con la determinación de proteínas. Este método no debe utilizarse para determinar proteínas con células sin lavar ya que el medio de incubación contiene suero fetal, que es un material rico en proteínas e introducirá errores en la determinación de proteínas. En este caso de células en cultivo fueron lavadas con buffer fosfato isotónico o Hanks y centrifugadas para obtener un sedimento celular.

Reactivos:

Estándar de albúmina sérica de bovino (casa Pierce) de 1 mg/ml

Ácido tricloroacético al 50%. ; NaOH 4N ; Tartrato de sodio y potasio al 2%.;
CuSO₄ al 1%;NaCO₃ de sodio al 2% disuelto en 0,1 N de NaOH

Reactivo de Folin-Ciocalteu.

Reactivo A de Lowry: Mezclar en un cilindro de 50ml de manera secuencial:

0.5 ml de Tartrato de sodio y potasio al 2% más 0,5 ml de CuSO₄ al 1% y se completa a 50 ml con NaCO₃ de sodio al 2% disuelto en 0,1 N de NaOH.

Procedimiento:

Se colocaron 30uL de deoxicolato de sodio (DOC) al 2% en tubos Pyrex (13 mm) y luego se añadió a las muestras de proteínas celulares, se completo con agua hasta 3 ml.y se mezclo de manera vigorosa a temperatura ambiente por 10 min. Luego, se añadió 0,5 ml de ácido tricloroacético al 50% agitando de manera vigorosa.

Posteriormente, se centrifugo en una centrifuga clínica a máxima velocidad por 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante fue removido de manera cuidadosa.

El precipitado fue resuspendido en 50μL de 4N NaOH, se añadió 250 μL de agua y se agito de manera vigorosa. Posteriormente, se añadió 2,5 ml de Reactivo A de Lowry y se incubo por 10 min a 37 °C bajo agitación suave.

Finalmente se añadion 0,250 ml del Reactivo de Folin-Ciocalteu diluido (1:1) con agua y se mezcla de manera vigorosa y luego se incubo por 10 min a 37 °C bajo agitación suave.

Luego se procedió a leer a 750 nm en espectrofotómetro Gilford con filtro rojo.

En la determinación de la concentración de proteínas de las células en cultivo se utilizaron los valores de absorbancia del patrón de BSA, siguiendo los principios de la ley de Lambert y Beer (187)

La determinación cualitativa y cuantitativa de la osificación mediante la formación de nódulos de mineralización utilizando el rojo de Alizarina.

Determinación Cualitativa:

La tinción con Rojo de alizarina (RA) ha sido utilizada durante décadas para evaluar los depósitos ricos en calcio de las células en cultivo. Es especialmente versátil porque permite determinar cualitativa y cuantitativamente si ocurre deposición de calcio en los cultivos. Se siguió el procedimiento descrito por Cao y col (190).

Los nódulos de calcio en osteoblastos en cultivo que estaban adheridos a la placa se determinó mediante la tinción con rojo de alizarina 2% pH 4,2 (AR; Sigma) durante 30 minutos a temperatura ambiente. El exceso del colorante fue aspirado, y las muestras fueron aclaradas cinco veces con agua desionizada para remover la alizarina no fijada. Las muestras fueron observadas mediante un microscopio de luz (190-191).

Determinación Cuantitativa:

Para la determinación cuantitativa se procedió a retirar el medio de cultivo y se realizaron tres lavados con PBS y a estos nódulos de calcio en osteoblastos en cultivo que están adheridos en las placas de 96 pozos se les agregaron 250 µl de rojo de alizarina 2% pH 4,2 (AR, Sigma) a cada uno de los pozos y se dejaron 30 min a 37 °C. (190-191).

El exceso del colorante fue aspirado, y las muestras fueron aclaradas cinco veces con agua desionizada para remover la alizarina no fijada. Las muestras fueron observadas mediante un microscopio de luz. Finalmente, el rojo de alizarina se extrae utilizando 250 µl por pozo de una solución de 20% Metanol y 10% Ácido

Acético (192) por 20 min y se leyó a 450nm. Este novedoso procedimiento se aplicó a las placas de 96 pozos, después de la remoción de las células en cultivo ya que los nódulos de mineralización quedan adheridos a la placa.

La determinación de hidroxiapatita (HA):

Este método se desarrolló de manera original ya que no existía hasta los actuales momentos en la literatura un método cuantitativo para determinar dicho complejo mineral como es la Hidroxipapatita en células en cultivo, que es la base fundamental del material óseo. Sin embargo, sí existen métodos para determinar el calcio total (191).

La curva de estandarización de la hidroxiapatita (HA) fue construida con un material obtenido de una casa comercial (BioGel HTP BioRad), y se realizó una curva estándar utilizando diferentes cantidades (0,5mg, 1mg, 2,5mg y 5 mg). La hidroxiapatita fue colocada en tubos Eppendorff y se le agregó 250 µl de rojo de alizarina 2% pH 4,2 (AR, Sigma) a cada uno de los tubos y se dejó 30 min a TA. Luego fue centrifugado a 8800 x g x 10 min a TA en una microcentrifuga Eppendorf #5413. El sobrenadante fue retirado cuidadosamente mediante aspiración y los sedimentos se lavaron con agua desionizada (tres veces) y se agitaron en un vortex, con la finalidad de retirar el exceso de rojo de alizarina, en cada lavado se realizó una etapa de centrifugación como antes descrito. Finalmente, el rojo de alizarina fue extraído utilizando una solución de 20% Metanol y 10% Ácido Acético (192). De esta solución coloreada se colocaron alícuotas de 200 µl en una placa de 96 pozos y se leyó en un lector de ELISA a 450 nm. Este novedoso procedimiento se aplicó a las placas de 96 pozos, después de la remoción de las células en cultivo ya que los nódulos de mineralización quedaron adheridos a la placa.

La tinción de Hematoxilina-Eosina.

Esta tinción clásica se realizó con la finalidad de estudiar la estructura celular, forma y localización del núcleo celular (193). El método supone la aplicación de la tinción de hematoxilina, que por ser catiónica o básica, tiñe estructuras ácidas (basófilas) en tonos azul y púrpura, como por ejemplo los núcleos celulares; y el uso

de eosina que tiñe componentes básicos (acidofilas) en tonos de color rosa, en función de su naturaleza aniónica o ácida, como el citoplasma. Dicha coloración se realizó como se describe a continuación:

- Los preparados histológicos se sumergieron en xilol para eliminar los excesos de parafina. El xilol es un alcohol tóxico pero existen reactivos (como el Hemo-D) que ejercen la misma función aclarante de parafina sin la toxicidad del xilol.
- Luego se pasaron por una serie de alcoholes en concentración decreciente para rehidratar la muestra (100°, 95° y 70°).
- Se lavaron en agua para eliminar exceso de alcohol
- Se sumergieron en hematoxilina por 10 minutos, luego se lavaron con agua para eliminar excesos y se paso rápidamente por alcohol ácido.
- Se lavaron nuevamente
- Se sumergieron por 30 segundos en eosina.
- Se pasaron por otra serie de alcoholes, esta vez en orden creciente (70°, 95° y 100°) para deshidratar la muestra y se realizo el montaje con un pegamento no soluble en agua.
- Finalmente se dejaron remojar 10 minutos en xilol, antes de realizar el montaje final.

La determinación del GMPc como expresión de la actividad de la GC-NPR-B en osteoblastos en cultivo.

La producción de GMP cíclico (GMPc) es una forma de evaluar la activación de la NPR-B por el CNP en osteoblastos de ratas en condición CONTROL y ratas en presencia de CNP y LPS. Los osteoblastos se pre-incubaron a 37 °C durante 15 min en la presencia de IBMX (100µM) (191) a fin de bloquear las fosfodiesterasas de los nucleótidos cíclicos (PDEs) y así evitar la degradación del GMPc, luego se añadió las sustancias a ensayar como son el CNP y el LPS y se incubó por 15 min a 37°C. La reacción se detuvo retirando el medio de inmediato y congelando las células en N₂ líquido. Luego se le añadio 500µl de ATC al 6% y se transfirió a tubos Eppendorff mezclando vigorosamente. La suspensión fue centrifugada a 1500 xgx 15 min. Los

sobrenadantes ácidos se removieron de los tubos y se extrajo dos veces con éter saturado con agua. Las soluciones acuosas fueron liofilizadas y luego resuspendidas en 150µl de agua desionizada antes de la determinación del GMPc producido. Luego se tomaron 50µl de la solución anterior para el radioinmunoensayo usando el kit de [³H] cGMP de Amersham Biosciences ®.

Este método se basa en la competencia del [³H]GMPc unido a un anticuerpo específico por el GMPc frío producido en las células en cultivo. La radiactividad [³H] se midió mediante espectrometría de centelleo líquido y se expresaron los resultados en pmoles de GMPc producidos/15 min/mg proteínas celulares (194).

La tabulación y análisis de los datos.

La tabulación y el análisis estadístico de los datos se realizó mediante el programa Microsoft Excel® 2007, haciendo los cálculos correspondientes a la media aritmética y al error estándar y como estudio estadístico de significación se utilizó la prueba T-Student, considerando estadísticamente significativo una $p < 0,05$. Los gráficos se realizaron utilizando el programa GraphPad® Prism 5.0. Los datos analizados corresponden a un rango de tres a seis experimentos realizados por separado, con cada condición evaluada por triplicado.

ASPECTOS ADMINISTRATIVOS.

Recursos humanos.

A continuación se nombran los laboratorios y las distintas secciones de investigación, donde se llevaron a cabo los diferentes experimentos contemplados en la realización de este trabajo.

Laboratorios y Secciones	Jefes de Laboratorio	Colaboradores
Laboratorio de cultivo celular del la Sección de Biomembranas en el IME. UCV.	Dra. Itala Lippo de Becemberg y Dra. Fabiola Placere-Uray	Sra. Eglis Chirinos
Sección de Bioterio del IME. UCV.	Dr. Manuel Moya	Sr. Estibens Castro Lugo
Sección de Microscopia Electrónica. Instituto Anatómico. UCV.	Dr. Marco Álvarez	Lic. Lourdes Perdomo

RESULTADOS

1.- El aislamiento y cultivo primario de osteoblastos a partir de calvaria de ratas Sprague Dawley

Los osteoblastos se aislaron a partir de calvaria de ratas neonatas siguiendo el método descrito por Israel y col (179). Brevemente, las células óseas fueron aisladas a partir de la calvaria de 8 ratas (Sprague-Dawley) de 2-3 días de nacidas (Figura 25). Las calvarias fueron diseccionadas bajo condiciones asépticas y aisladas de los tejidos blandos circundantes seguidamente se realizaron 3 lavados consecutivos empleando PBS 1X estéril, se eliminó el periostio como se observa en la Figura 25. Las calvarias fueron cortadas en trozos de 1 mm² aproximadamente y se incubaron en una solución de digestión (SD), la cual contenía: DMEM pH 7,5; 5 mg/ml de collagenasa tipo II; 2,5 mg/ml de tripsina y 1 mM EDTA, durante 20 min. a 37 °C/5 min. El tejido fraccionado que contenía las células óseas (y otras células propias del tejido) fue centrifugado a 1500g x 5 min., empleando una centrífuga Sorvall refrigerada. El sedimento celular fue re-suspendido en DMEM suplementado con 20% SFB (suero fetal bovino) y antibióticos (100 U/ml penicilina y 100 mg/ml estreptomicina) y sembrados en placas de cultivo (100 x 15mm) a una densidad de 6 x10⁵ células. El cultivo celular se incubo a 37 °C en atmósfera húmeda y 5% CO₂. El medio fue cambiado a las 24 h de cultivo, a fin de descartar las células y partículas no adheridas, considerando que las células de nuestro interés son aquellas que permanecen adheridas.

La población celular alcanzo aproximadamente un 15 % de confluencia en la placa de cultivo, a las 24 h como se observa en la Figura 26, lo que se consideraba un aislamiento exitoso de células adherentes.

Las células adheridas fueron cultivadas realizando cambios de medio inter-diario, transcurrido 48 h de cultivo, las mismas alcanzaban un 50% de confluencia tal como se puede observar en la Figura 27.

Transcurridas, 72 h de cultivo se observaba una confluencia entre un 90 al 98 % como se puede apreciar en la Figura 28. Cuando se alcanzó este punto de

confluencia fue preciso realizar pasajes a fin de expandir la población celular y de esta manera tener una población celular osteoblástica homogénea.



Figura 25. A. Ratas recién nacidas Sprague-Dawley. B. Cabeza donde está marcada en círculo rojo la calvaria. C. Las calvarias (n=3) de ratas Sprague-Dawley en placa de Petri con DMEM que fueron procesadas como se describe en la Metodología.

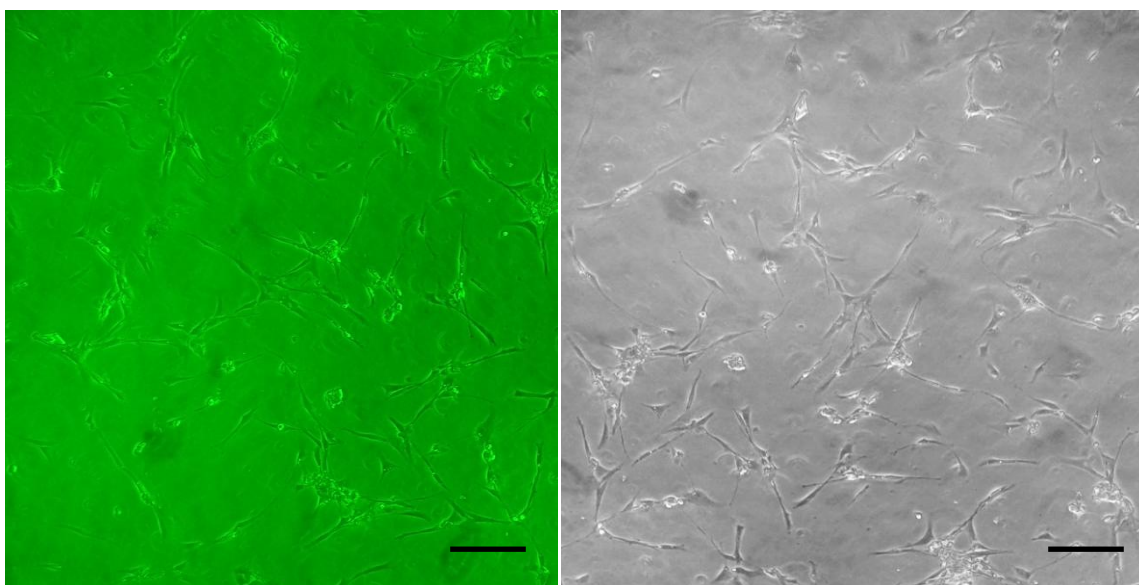
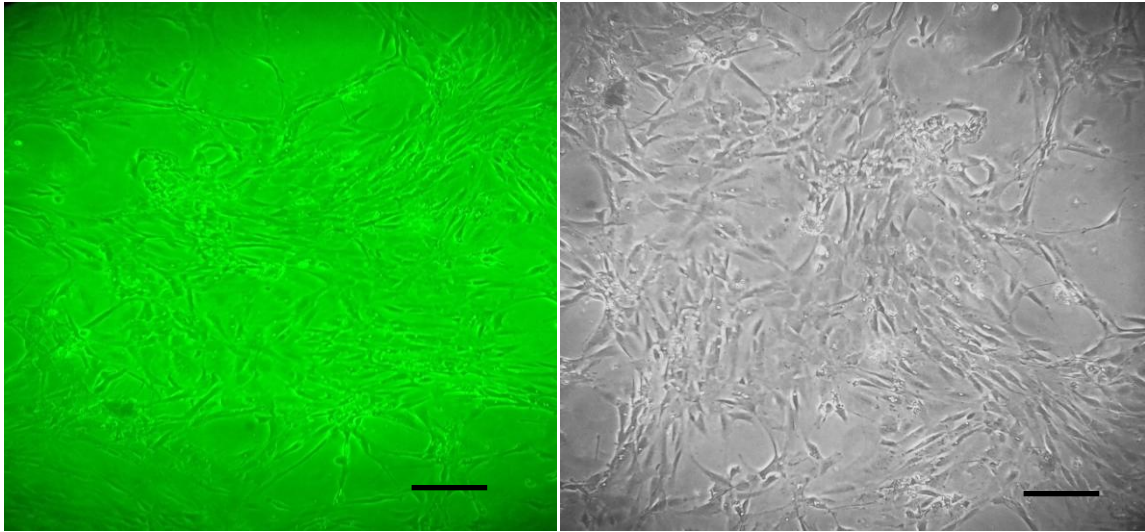


Figura 26. El cultivo de osteoblastos a las 24 h con un 15 % de confluencia. La Microfotografía de la sección A: Observación directa y la sección B es con un filtro en escala de grises. Magnificación de 10X en un microscopio invertido Nikon. Barra 0,11 mm.

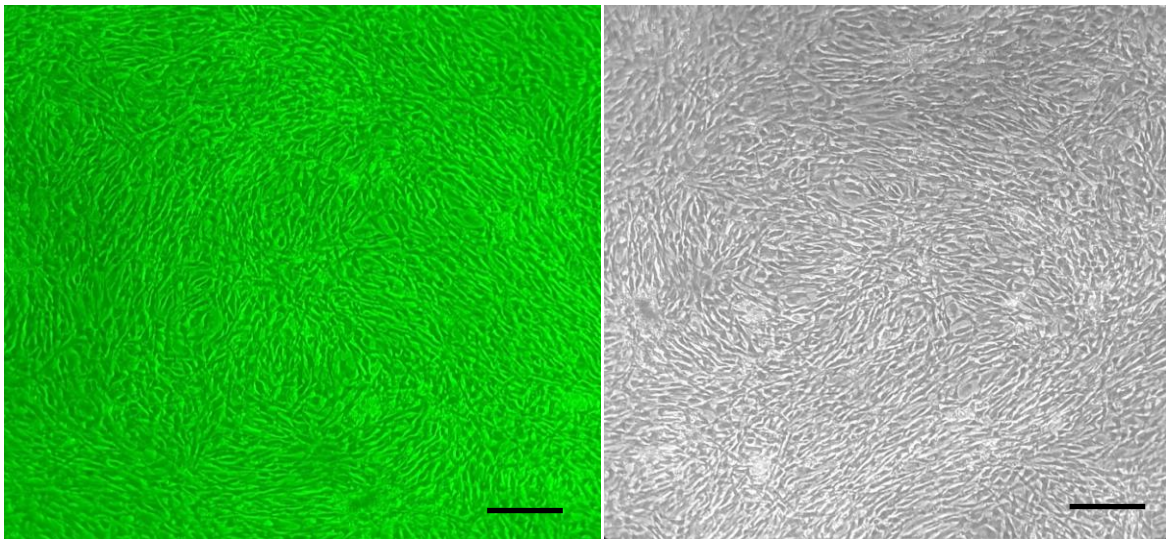


A

B

Figura 27. Cultivo de osteoblastos 48 h con un 50 % de confluencia.

La microfotografía en la sección A: Observación directa y la sección B es con un filtro en escala de grises. Magnificación de 10X en un microscopio invertido Nikon. Barra 0,11 mm.



A

B

Figura 28. El cultivo de osteoblastos a las 72 h con un 95-98 % de confluencia.

La microfotografía en la sección A: Observación directa y la sección B es con un filtro en escala de grises. Magnificación de 10X en un microscopio invertido Nikon. Barra 0,11 mm.

2.- La caracterización del fenotipo de la población celular de los osteoblastos en cultivo mediante la tinción de Hematoxilina/eosina y rojo de alizarina.

Coloración con Hematoxilina y Eosina

Las células en cultivo de osteoblastos provenientes de calvaria de rata fueron fijadas y procesadas para realizar la coloración clásica de Hematoxilina-Eosina (H/E), a fin de caracterizar su fenotipo celular, observándose que a las 24 h de cultivo, estas células presentan un fenotipo característicos con los osteoblastos inmaduros. Mostraron ser células fusiformes con un núcleo central y con presencia de nucléolos en algunas de ellas, como se muestra en la Figura 29A. Transcurrido 72 horas de cultivo se puede observar que los osteoblastos presentaban un cambio en su fenotipo a células de aspecto cúbico o con citoplasma basófilo registrándose además la presencia de pseudópodos. (Figura 29B). Adicionalmente, durante el proceso de crecimiento estas células osteoblásticas presentan inhibición por contacto agrupándose en la placa de cultivo de manera organizada, sincronizadas y formando una monocapa confluyente (Figura 28).

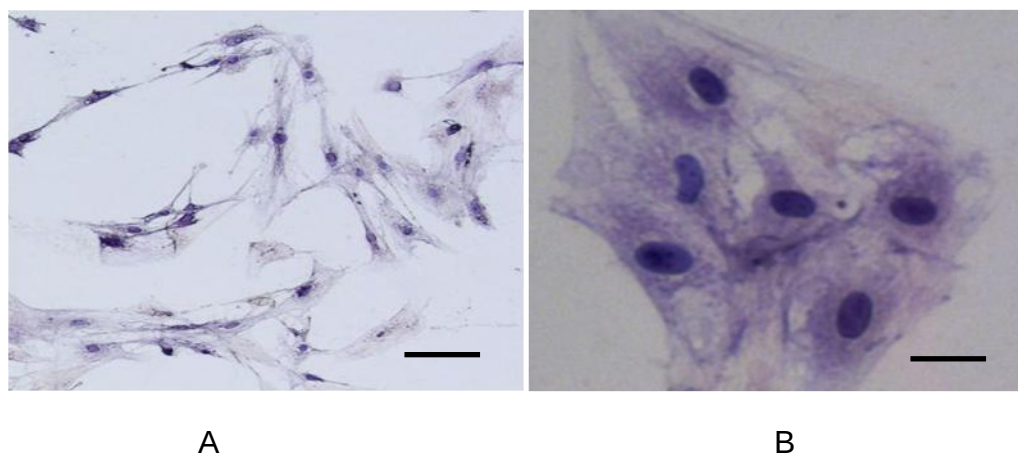


Figura 29. Cultivo de osteoblastos.

A) Tinción de H/E de los osteoblastos en cultivo a las 24 h. Células fusiformes con un núcleo central que es un fenotipo de osteoblastos inmaduros. B) Tinción de H/E de los osteoblastos en cultivo a las 72 h con una morfología característica tetraédrica o cúbica de células diferenciadas como son los osteoblastos maduros. Microscopio Olympus IX71 (60X). Barra 0,11 mm.

La tinción de Rojo de Alizarina

Una vez caracterizado el fenotipo celular durante el crecimiento de las células y a fin de continuar con el proceso de caracterización de las mismas, procedimos a evaluar de manera cualitativa, el proceso de osificación, para tal fin utilizamos rojo de alizarina (RA) al 2% a fin de teñir los depósitos de calcio (hidroxiapatita) en el interior de las células como ha sido descrito por Cao y col. (12). Esta tinción se llevó a cabo en cada uno de los pasajes de las células a fin evaluar su maduración.

En las células en cultivo a las 24 h, la tinción con RA al 2% mostró, que dichos depósitos intracelulares no estaban presentes en estas células (Figura 30).

Las células a partir de las 72 h de cultivo presentaron una coloración intensa al usar el RA observándose en forma de gránulos los depósitos del calcio (hidroxipatita) en el interior de dichas células (Figura 31).

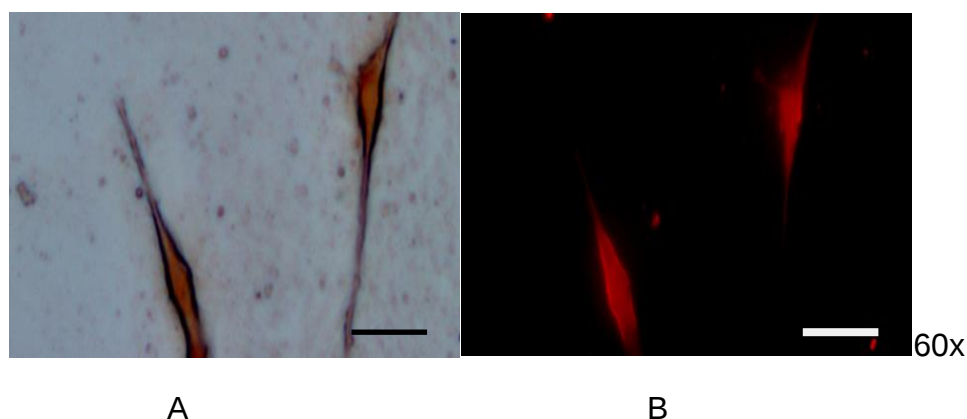
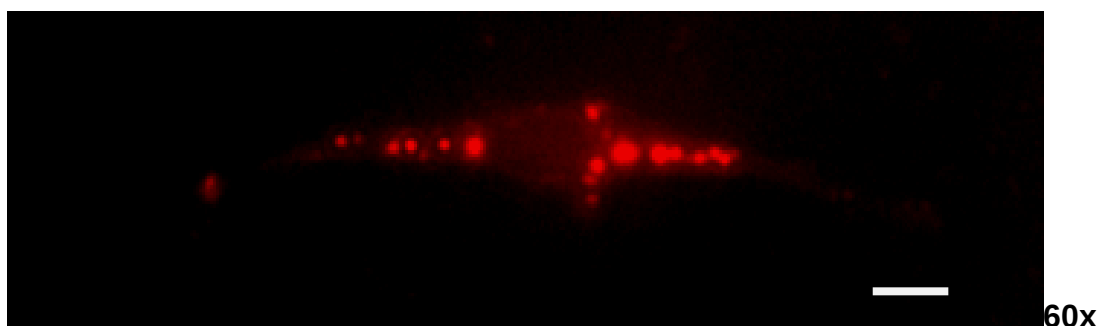


Figura 30. A: Micrografía de osteoblastos inmaduros (24 h) teñidos con rojo de alizarina al 2%. A- Se observan células fusiformes (osteoblastos inmaduros) con microscopio Olympus XT1 de Fluorescencia sin filtro. B- Los mismos osteoblastos pero usando Filtro YEP 490-500 nm, evidenciando la ausencia de depósitos de calcio intracelular. Barra 0,11 mm



A



B

Figura 31. Micrografía de un osteoblasto maduro (72 h) teñido con rojo de alizarina al 2%. A- Osteoblasto observado con microscopio Olympus IXT1 de Fluorescencia sin filtro. B- Usando el Filtro YEP 490-500 nm, el mismo osteoblasto mostró depósitos de calcio intracelular teñido con rojo de alizarina característicos de estas células. Barra 0,11 mm.

La evaluación de la maduración de los osteoblastos durante el periodo de cultivo celular.

El proceso de maduración de los osteoblastos en cultivo bajo las condiciones descritas en la metodología se resume en la Figura 32. En la primera sección se observa como cambia el cultivo de osteoblastos desde un 15% a las 24 h hasta un 95-98 % de confluencia a las 72 h. Estas micrografías son el resultado de una observación directa utilizando un microscopio invertido Nikon.

El segmento intermedio de la Figura 32 representa la tinción con H/E. Los osteoblastos en cultivo a las 24 h presentan un fenotipo de osteoblastos inmaduros, es decir, son células fusiformes con un núcleo central y con presencia de nucléolos en algunas de ellas, tal como se observa en la Figura 29A, morfología que va

modificándose con el tiempo de cultivo (cultivo a las 48 h). Posteriormente cuando el tiempo de cultivo progresa (72 h), se observan células compatibles con osteoblastos maduros que son células de aspecto cúbico con citoplasma basófilo y presencia de pseudópodos (Figura 29B). Estas células presentan inhibición por contacto organizándose en la placa de cultivo formando una monocapa confluyente al cabo de 72 h de cultivo.

El tercer segmento de la Figura 32 ilustra la tinción con rojo de alizarina, para demostrar la presencia de depósitos de calcio a distintos tiempos de cultivo. Así, a las 24 y 48 h de cultivo se observa una confluencia de 15% y 50% respectivamente y utilizando la tinción con rojo de Alizarina no se evidencia la formación de nódulos de mineralización. Sin embargo, transcurrido 72 h de cultivo se observa una mayor confluencia (90-98%) y la formación de nódulos de mineralización (depósitos de calcio).

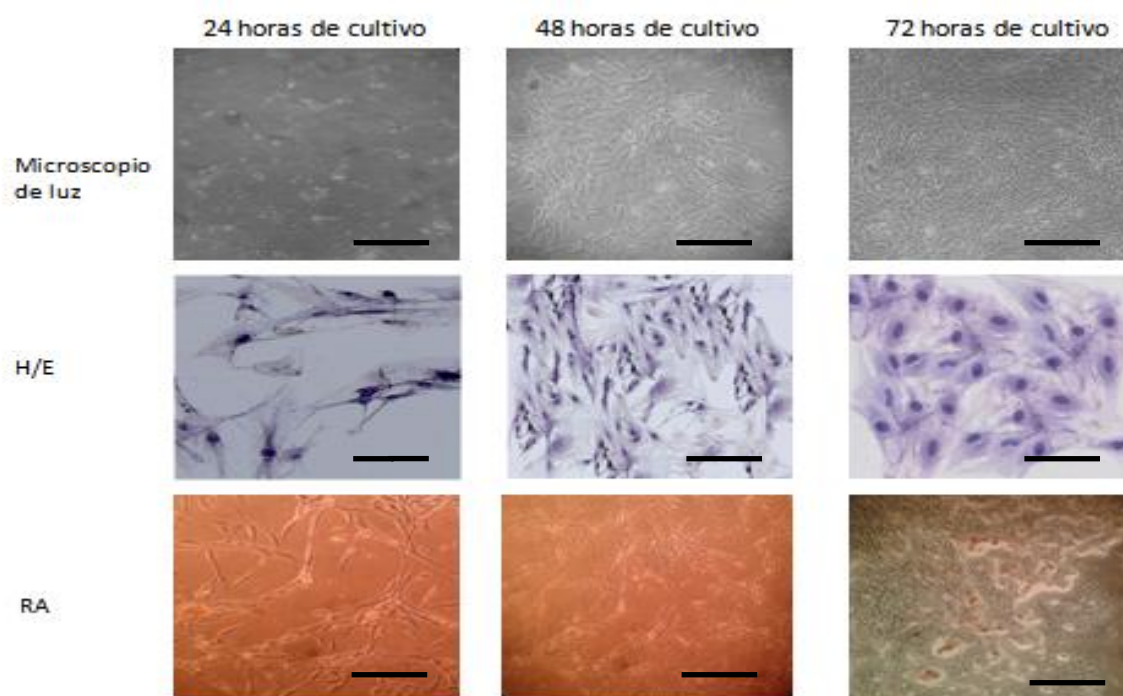


Figura 32. Los cultivos de osteoblastos en distintos tiempos: 24, 48 y 72 h bajo microscopio de luz (10X), la coloración de H/E y la tinción de rojo de alizarina (RA).

Microscopio Olympus IX71 de Fluorescencia Para H/E y RA (60X). Barra 0,11 mm.

3.- Estudio de la proliferación basal de los osteoblastos en cultivo durante 24, 48 y 72 horas y en respuesta al SFB, la IL6, el TNF α , el CNP y al LPS.

La proliferación celular de los osteoblastos se evaluó a través de dos métodos tales como: El método MTS-PMS y la determinación de proteínas celulares utilizando el método de Lowry modificado por Bensadoun.

El método MTS-PMS (CellTiter 96®) depende de la producción celular de NADH y de una intensa actividad mitocondrial asociada a la división celular, lo cual conduce a la conversión celular de una sal de tetrazolio en un producto de formazan que se detecta fácilmente usando un lector de placas de 96 pozos a 492nm. El ensayo CellTiter 96® tiene varias ventajas sobre otros ensayos como son, el conteo celular o del método clásico vinculado a la incorporación de ^3H timidina. Debido a que el ensayo CellTiter 96® no es radioactivo, se eliminan el uso de isótopos y los costos del líquido de centelleo y la infraestructura requerida. Además, el ensayo se realiza completamente en una placa de 96 pozos, sin etapas que requieran el lavado de las células, o la eliminación de la solución de dichos pozos. El ensayo puede usarse tanto para células adheridas o como para células en suspensión. Las placas de ensayo se leen usando un lector (ELISA) de placas de 96 pozos, facilitando la recopilación de datos y los cálculos ulteriores.

Inicialmente se procedió a evaluar la proliferación de los osteoblastos en cultivo empleando una mezcla compleja de mitógenos, que se utiliza de manera clásica como, es el Suero Fetal Bovino (SFB). Una actividad de proliferación basal (sin SFB), estuvo presente. El SFB, de una manera dependiente de su concentración, fue capaz de incrementar la proliferación celular. Esta estimulación aumenta al incrementar los tiempos de cultivo (24, 48 y 72 h), y fue significativa cuando se emplea el SFB al 10 y al 20 % como se muestra en la Figura 33.

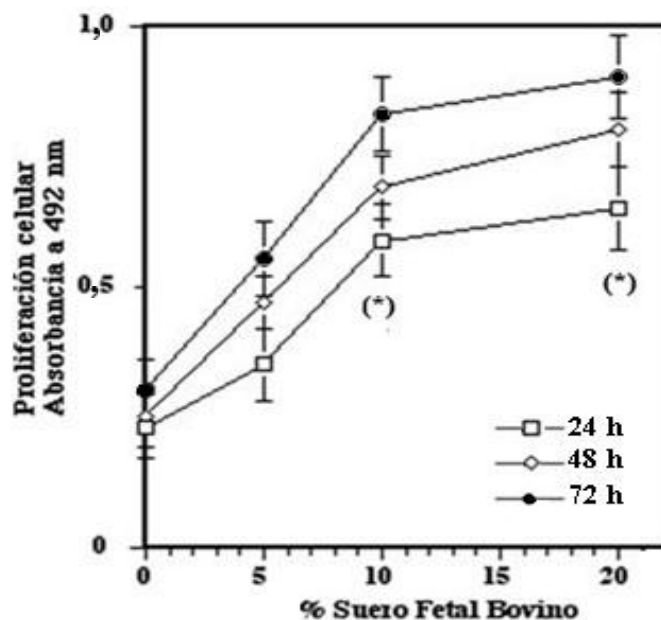


Figura 33. El efecto del Suero Fetal Bovino sobre la proliferación de osteoblastos en cultivo utilizando el método MTS-PMS (Absorbancia a 492 nm).

Las células (1×10^4) fueron cultivadas en placas de 96 pozos como se describe en la Metodología. Cada punto es el promedio ($\bar{X} \pm ES$) de determinaciones ($n=5$) realizadas por duplicados. (*): $p < 0,05$ diferencia significativa entre 10 y 20 % SFB vs 0 % SFB a las 48 y 72 h.

Otra forma de evaluar la proliferación celular es determinar la cantidad de proteínas celulares. La determinación de proteínas fue realizada mediante el método de Lowry modificado por Bensadoun como se describió en la Metodología. Así, en la Figura 34 se puede observar que la proliferación celular se incrementa de manera lineal, en función del tiempo y que esta proliferación fue dependiente de la concentración de SFB, siendo mayor al 20% de SFB.

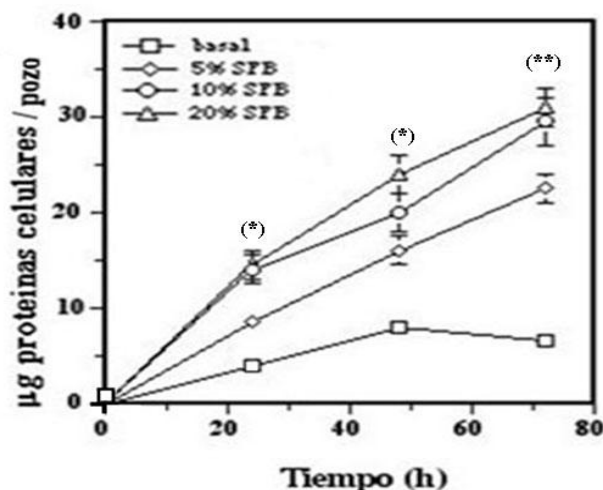


Figura 34. El efecto del tiempo de cultivo y de diferentes concentraciones del SFB sobre la proliferación de osteoblastos evaluando la concentración de proteínas celulares como se describe en la Metodología.

Las células (1×10^4) fueron cultivadas en placas de 96 pozos como se describe en la Metodología. Cada punto es el promedio ($\bar{X} \pm ES$) de determinaciones ($n=5$) realizadas por duplicados (*). $p < 0,05$ diferencia significativa a las 24 y 48 h a todas las concentraciones de SFB. (**): $p < 0,005$ la significancia a las 72 h en relación a la condición basal.

A fin de evaluar la respuesta proliferativa de estas células en cultivo utilizamos citoquinas pro-inflamatorias como son la IL-6 y el TNF- α . De manera interesante, bajo las condiciones experimentales empleadas en este trabajo, la IL-6 a 0,5 y 1 ng/ml fue capaz de estimular la proliferación de los osteoblastos, pero al incrementar la concentración de esta interleuquina a 10 ng/ml se observó una disminución de la proliferación celular, siendo mayor dicha disminución a 100 ng/ml de IL-6 como se puede observar en la Figura 35. Resultados similares fueron observados en el caso de la otra citoquina como es el TNF- α pero la estimulación a 1 ng/ml fue menor para el TNF- α en comparación con la IL-6. Al aumentar la concentración de TNF- α se produce una disminución, que no fue significativa de la proliferación celular como se observa en la Figura 36. Además se observó que la reducción de la proliferación de ambas citoquinas era mayor al aumentar el tiempo de cultivo, siendo más pronunciado a las 72 h, en relación a la 24 h, como se puede observar en la Figura 35 y 36.

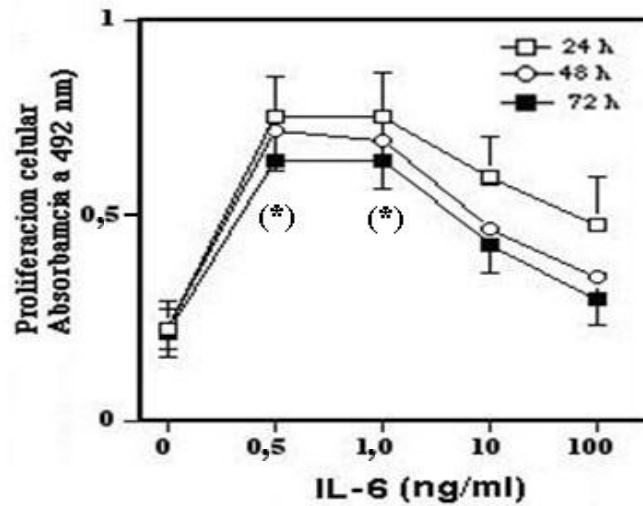


Figura 35. El efecto de concentraciones crecientes de IL-6 sobre la proliferación de osteoblastos en función del tiempo de cultivo.

La proliferación celular fue evaluada mediante el método MTS-PMS (Absorbancia a 492 nm) como se describe en Métodos. Las células (1×10^4) fueron cultivadas en placas de 96 pozos como se describe en la Metodología. Cada punto es el promedio ($\bar{X} \pm ES$) de determinaciones ($n=5$) realizadas por duplicados. (*): $p < 0,05$ diferencia significativa entre basal vs 0,5 y 1,0 ng/ml de IL-6 a las 24, 48 y 72 h de cultivo.

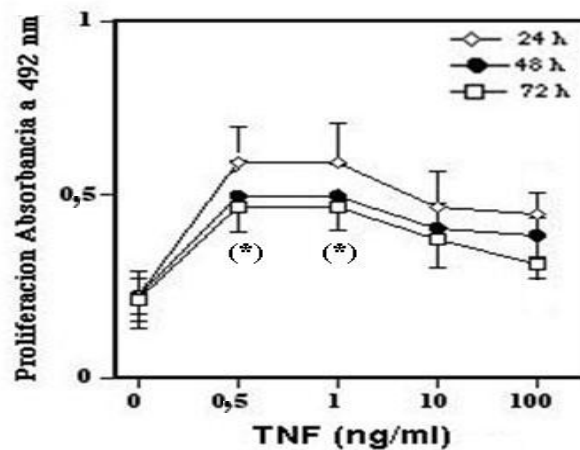
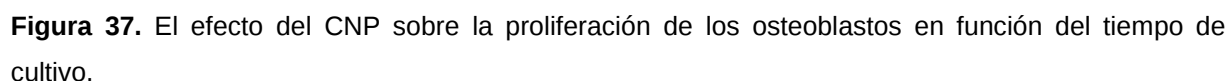


Figura 36. El efecto del TNF- α sobre la proliferación de osteoblastos en función del tiempo de cultivo.

La proliferación fue evaluada mediante el método MTS-PMS (Absorbancia a 492 nm) como se describe en Métodos. Las células (1×10^4) fueron cultivadas en placas de 96 pozos a diferentes periodos de tiempo. Cada punto es el promedio ($\bar{X} \pm ES$) de determinaciones ($n=5$) realizadas por duplicados. (*): $p < 0,05$ diferencia significativa entre basal vs 0,5 y 1,0 ng/ml de TNF- α a las 24, 48 y 72 h de cultivo.

Los osteoblastos en cultivo fueron expuestos a concentraciones crecientes del CNP (0.5-100 nM) y a diferentes tiempos de cultivo. En estas condiciones, se encontró que el CNP fue capaz de inducir una estimulación sostenida de la proliferación de los osteoblastos, de una forma dosis-dependiente, y que esta estimulación aumenta en el transcurso del tiempo de cultivo de los osteoblastos, observándose la mayor proliferación, a una concentración de CNP 100 nM y a las 72 horas de cultivo. Estos resultados se muestran en la Figura 37.



74

De manera similar, los osteoblastos en cultivo fueron expuestos a concentraciones crecientes del LPS (1.0-100 ng/ml) y a diferentes tiempos de cultivo. En estas condiciones, se encontró que el LPS fue capaz de inducir una inhibición de la proliferación basal de los osteoblastos, efecto inhibitorio que fue significativo a las 48 y 72 h de incubación de las células en cultivo pero no así a las 24 h como se puede observar en la Figura 38.

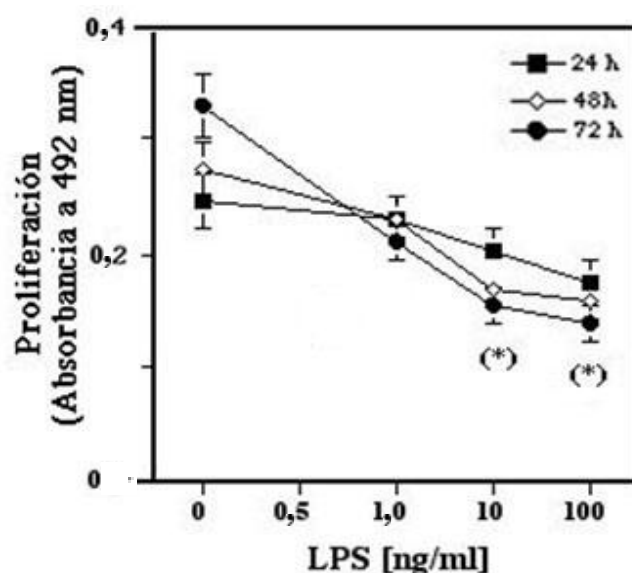


Figura 38. El efecto del LPS sobre la proliferación de los osteoblastos en función del tiempo de cultivo. La proliferación fue evaluada mediante el método MTS-PMS (Absorbancia a 492 nm) como se describe en Métodos. Las células (1×10^4) fueron cultivadas en placas de 96 pozos y mantenidas en cultivo a diferentes periodos de tiempo. Cada punto es el promedio ($\bar{X} \pm ES$) de determinaciones ($n=5$) realizadas por duplicados. (*): $p < 0,05$ diferencia significativa entre basal vs 10 y 100 ng/ml LPS a las 48 y 72 h.

A manera de resumen sobre la actividad proliferativa de los osteoblastos en cultivo se muestra en la Figura 39. El SFB al 20% estimuló de manera significativa ($p < 0.05$) la proliferación en 1,8 veces mientras que el CNP (100 nM) estimuló en más de 2,8 veces ($p < 0.01$), siendo este péptido natriurético, el mayor estimulador de la proliferación de los osteoblastos en cultivo. Adicionalmente se observa que el LPS, la IL-6, y el TNF- α redujeron de manera significativa ($p < 0.05$) dicha proliferación basal en un rango del 30% hasta un 40 %.

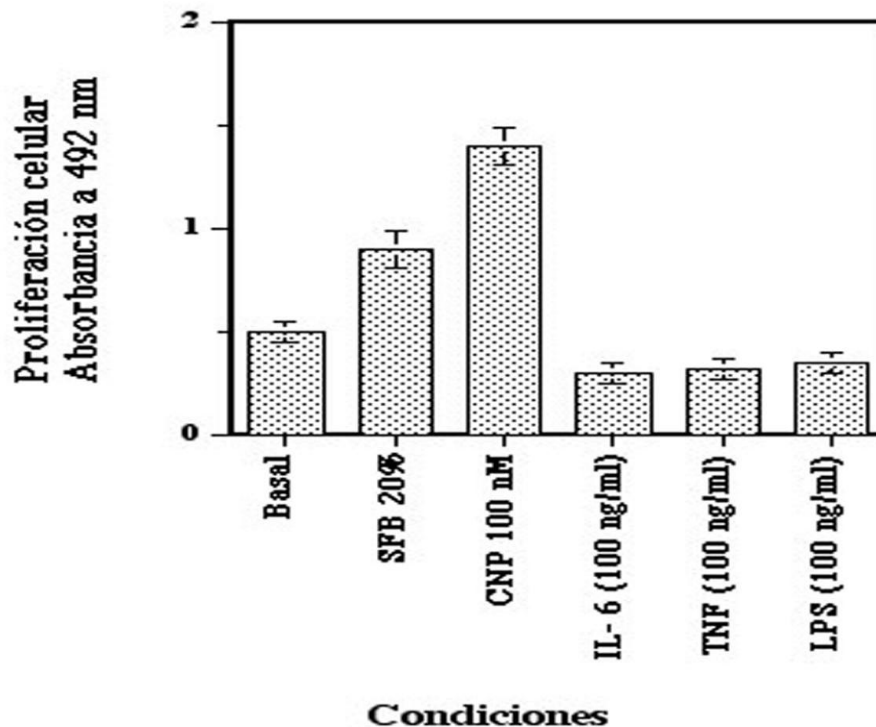


Figura 39. Gráfica resumen sobre el efecto del SFB 20%, el CNP (100 nM), la IL-6 (100 ng/ml), el TNF- α (100 ng/ml) y el LPS (100 ng/ml) sobre la proliferación de los osteoblastos a las 72 h de cultivo

4.- La actividad de la fosfatasa alcalina en los osteoblastos en cultivo durante 24, 48 y 72 horas y en presencia del SFB, la IL-6, el TNF- α , el CNP y el LPS.

La estandarización y la determinación de la fosfatasa alcalina (FA) en los cultivos de osteoblastos como un marcador bioquímico de la actividad osteoblástica.

La determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina es una manera indirecta de evaluar la capacidad del osteoblasto para producir hidroxipatita. Éste es un compuesto inorgánico de calcio/fosfato, cuya formación representa el paso inicial para el proceso de osificación. La hidroxipatita (HA), es una forma natural de apatita cálcica con la fórmula $(\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH}))$, pero suele escribirse $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

Para poder determinar la actividad de una enzima en medios de cultivos, es necesario establecer previamente la proporcionalidad entre la actividad enzimática, en este caso, la actividad de la fosfatasa alcalina (FA) y la cantidad de proteínas celulares o número de células en cultivo. La determinación de proteínas celulares es

un método más preciso ya que el conteo de células utilizando el método del hemocitómetro depende de la capacidad y la variabilidad del observador para realizar dicho conteo. Por lo tanto, la determinación de la concentración de proteínas celulares fue escogida como un parámetro mas objetivo y preciso para establecer la proporcionalidad entre la actividad de FA y las proteínas celulares como se puede observar en la Figura 40. La actividad FA fue ensayada utilizando un rango entre 10-80 μg de proteínas provenientes de cultivo de osteoblastos de 72 h. La actividad FA fue determinada a 37 °C durante 2 h mediante la liberación del p-Nitrofenol (Absorbancia a 405 nm) a partir del p-Nitrofenilfosfato como sustrato, tal como se describe en Métodos.

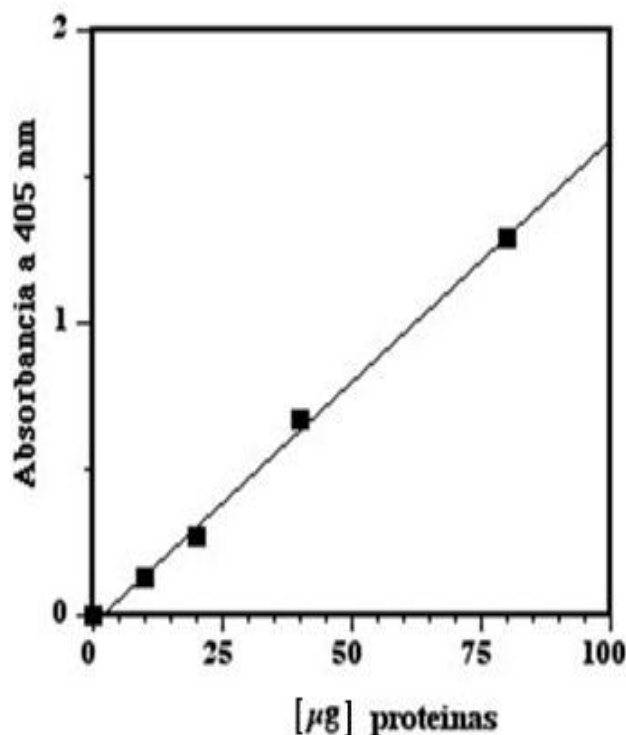


Figura 40. La curva de estandarización de la actividad de la fosfatasa alcalina (FA) en osteoblastos de 72 h de cultivo.

La actividad de la FA fue determinada a 37 °C durante 2 h como se describe en Métodos, utilizando la liberación del pNF (Absorbancia a 405 nm) a partir del p-NFF como sustrato. Los resultados son el promedio de 3 experimentos por duplicado. La actividad enzimática utilizando el p-nitrofenilfosfato fue estimada por la cantidad de p-nitrofenol liberado a 405 nm.

Así mismo se realizaron ensayos de FA, a las 1, 2 y 3 horas de incubación en osteoblastos de 72 h de cultivo a 37 °C para establecer la linealidad, en función del tiempo del ensayo, habiéndose encontrado que la reacción enzimática fue lineal hasta las 2 h, como se observa en la Figura 41.

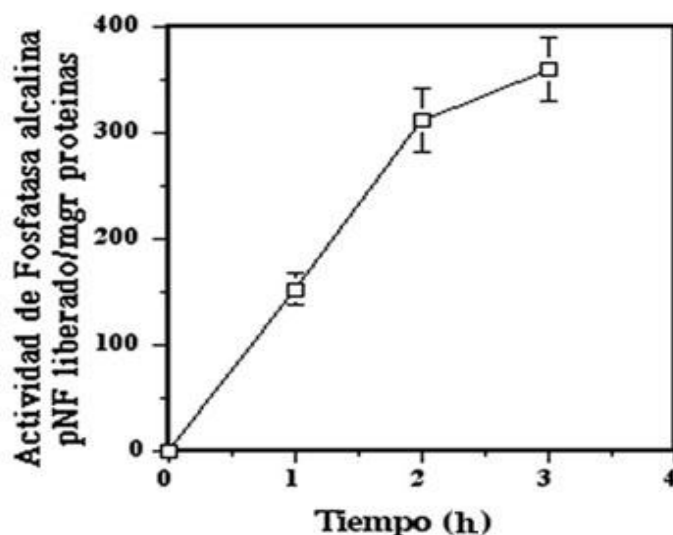


Figura 41. Actividad de fosfatasa alcalina en función de tiempo de ensayo.

La actividad de FA (nmoles de pNF/mg proteínas) se determinó a 405 nm utilizando el p-NFF como sustrato como se ha descrito en la Metodología utilizando entre 20-50 µg de proteínas provenientes de osteoblastos de 72 h de cultivo. Cada valor es el promedio ($\bar{X} \pm ES$) de 5 experimentos (n=5) realizados por duplicados.

La actividad de la fosfatasa alcalina se determinó de manera inicial en los osteoblastos (24, 48 y 72 h) de cultivo que fueron expuestos a concentraciones crecientes de SFB al 5, 10 y 20%. En la Figura 42 se puede observar que la actividad de FA aumenta al incrementar la concentración del SFB (5-20%) y el tiempo de cultivo (24, 48 y 72 h), registrándose un aumento exponencial a las 72 h para todas las concentraciones del SFB. La actividad de esta enzima aumenta a las 72 h en más de 2.9 veces y siendo dependiente de la concentración del SFB, lo cual coincide con el proceso de deposición de hidroxiapatita (HP) tal como fue demostrado cualitativamente en la Figura 32. Estos resultados indican que los cultivos de osteoblastos utilizados en este trabajo expresan la actividad enzimática marcadora clásica de los osteoblastos, como es la Fosfatasa alcalina (FA).

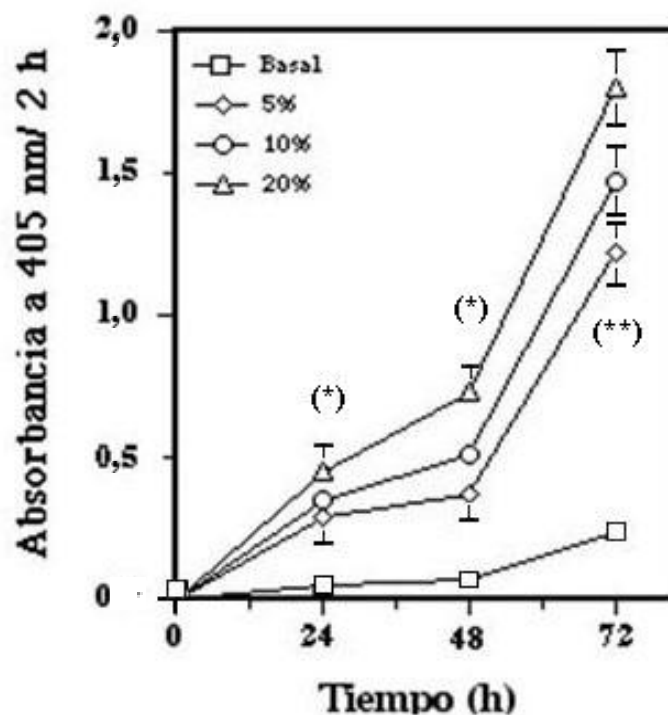


Figura 42. La actividad de FA a diferentes tiempos: 24, 48 y 72 h y utilizando SFB a distintas concentraciones: 0% (Basal), 5%,10% y 20%.

La actividad de FA se determinó durante 2 h midiendo la absorbancia (405 nm) en las placas de cultivo y en cada pozo utilizando un lector ELISA. Cada punto es el promedio de 5 determinaciones enzimáticas realizadas por duplicado. (*) $p < 0,05$ diferencia significativa a las 24 y 48 h a las concentraciones de SFB. (**): $p < 0,005$ la significancia a las 72 h en relación a la condición basal.

Adicionalmente, la actividad de la fosfatasa alcalina fue determinada en presencia de citoquinas pro-inflamatorias como son la IL-6 y el TNF- α . Tal como se observa en la Figura 43, la IL-6 induce una disminución de la actividad de la FA en todas las condiciones experimentales ensayadas, obteniéndose un mayor efecto a la concentración de 100 ng/ml de esta interleuquina proinflamatoria.

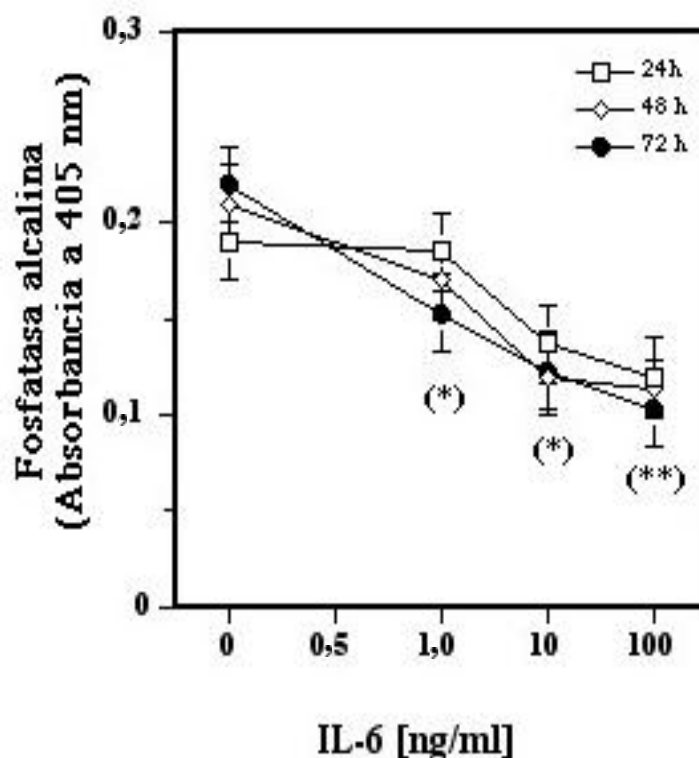


Figura 43. El efecto de la IL-6 sobre la actividad de FA en osteoblastos en función del tiempo de cultivo.

La actividad de FA se determinó durante 2 h midiendo la absorbancia (405 nm) en las placas de cultivo, utilizando un lector ELISA. Cada punto es el promedio ($\bar{X} \pm \text{ES}$) de determinaciones ($n=5$) realizadas por duplicados. (*): $p < 0,05$ diferencia significativa a 1 ng/ml y 10 ng/ml de IL-6 a las 72 h en relación con su respectiva basal. (**): $p < 0,05$ la significancia fue mayor a 100 ng/ml de la IL-6 en todas las condiciones en relación con su respectiva basal.

Resultados muy similares fueron obtenidos al utilizar el TNF- α en los osteoblastos a diferentes tiempos de cultivos, como se puede observar en la Figura 44, registrándose que el TNF- α a la concentración de 1 y de 10 ng/ml produjo una reducción de la expresión de la actividad de FA a las 72 h. Esta reducción en la expresión de la actividad de la FA fue más pronunciada a la concentración de 100 ng/ml, a todos los tiempos de cultivo.

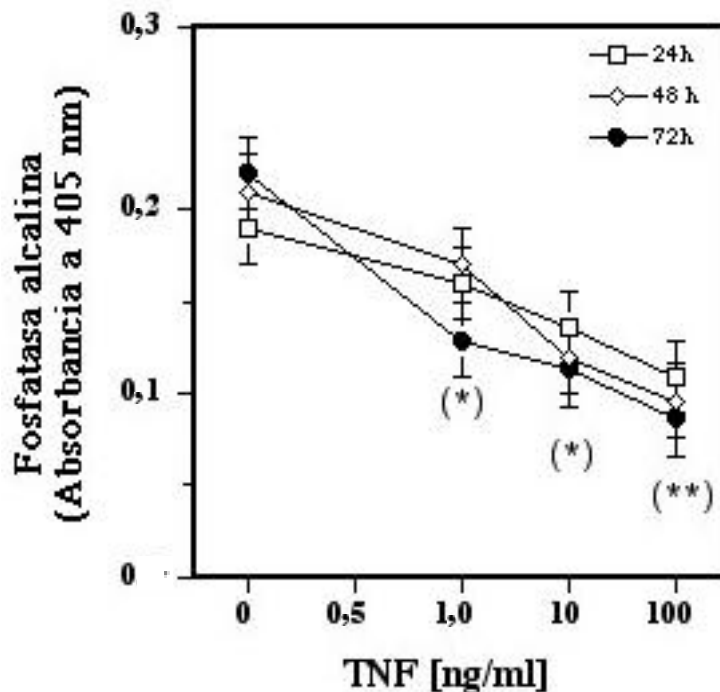


Figura 44. El efecto del TNF- α sobre la actividad de FA en osteoblastos en función del tiempo de cultivo.

La actividad de FA se determinó durante 2 h midiendo la absorbancia (405 nm) en las placas de cultivo y en cada pozo a utilizando un lector ELISA. Cada punto es el promedio ($X \pm ES$) de .determinaciones (n=5) realizadas por duplicados. (*): $p < 0,05$ diferencia significativa a 1 ng/ml y 10 ng/ml de TNF- α en todas las condiciones en relación con su respectiva basal. (**): $p < 0,05$ la significancia a 100 ng/ml de TNF- α en todas las condiciones y en relación con su respectiva basal.

Estos resultados demuestran que las citoquinas pro-inflamatorias, IL-6 y TNF- α producen una inhibición significativa de la actividad de FA en los osteoblastos en cultivo. Seguidamente se hicieron ensayos empleando el LPS y el CNP para evaluar sus efectos sobre la actividad de FA en los osteoblastos en cultivo. Podemos observar, que el LPS a una concentración de 100 ng/ml produjo una reducción significativa ($p < 0.05$) en la actividad de la FA en los osteoblastos en cultivo a todos los tiempos de incubación y en relación con su respectiva basal, como se muestra en la Figura 45.

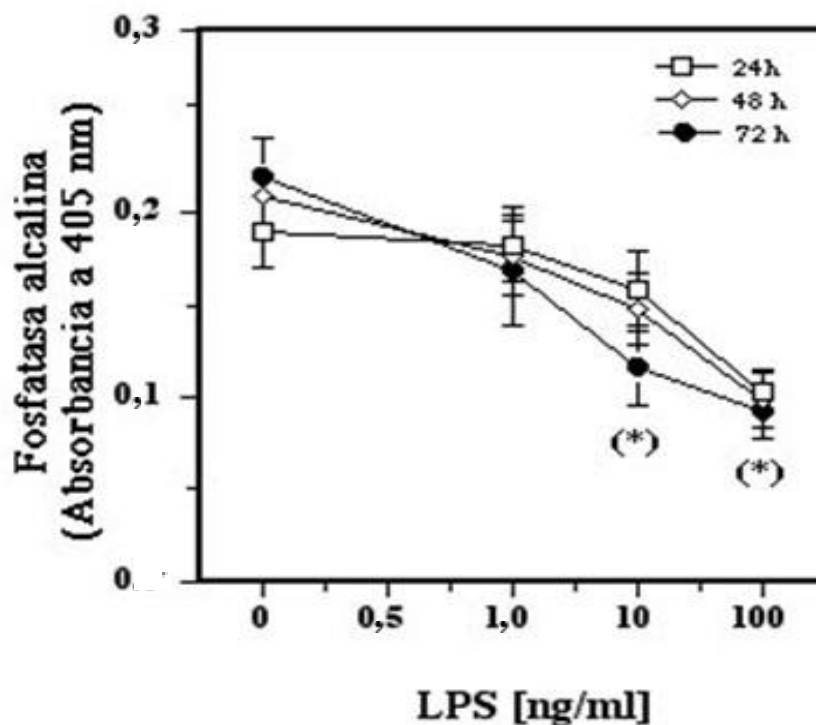


Figura 45. El efecto del LPS sobre la actividad de FA en osteoblastos en función del tiempo de cultivo. La actividad de FA se determinó durante 2 h midiendo la absorbancia (405 nm) en las placas de cultivo y en cada pozo a utilizando un lector ELISA. Cada punto es el promedio ($X \pm ES$) de determinaciones ($n=5$) realizadas por duplicados. (*): $p < 0,05$ diferencia significativa a 10 y 100 ng/ml de LPS en todas las condiciones en relación con su respectiva basal.

Por otra parte y en sentido contrario, el CNP produjo un aumento en la expresión de la FA, dependiente de la concentración de este péptido natriurético y del tiempo de cultivo. De manera interesante, el CNP a todas las concentraciones utilizadas produjo un aumento de la expresión de la actividad de la FA, en relación con la actividad basal. A una concentración de CNP 100nM, se obtuvo un incremento de 12 veces a las 24 h, de 14 veces a las 48 h y de 15 veces a las 72 h de cultivo de la actividad de FA. Estos resultados se pueden observar en la Figura 46.

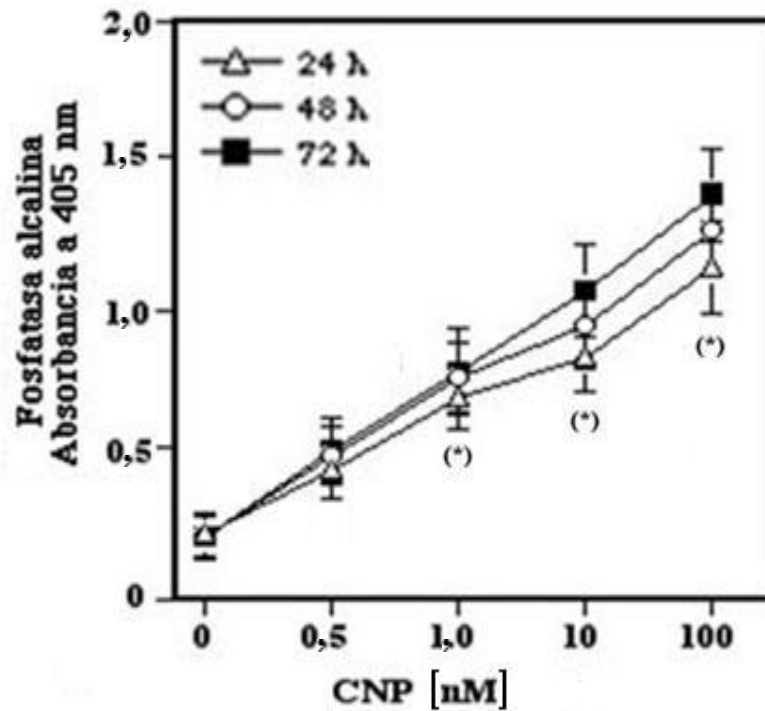


Figura 46. El efecto del CNP sobre la actividad de FA en osteoblastos en función del tiempo de cultivo.

La actividad de FA se determinó durante 2 h midiendo la absorbancia (405 nm) en las placas de cultivo y en cada pozo utilizando un lector ELISA. Cada punto es el promedio ($\bar{X} \pm ES$) de determinaciones ($n=5$) realizadas por duplicados. (*): $p < 0,05$ diferencia significativa entre 0 CNP y 1.0, 10, 100 nM CNP a las 24, 48 y 72 h.

En relación al parámetro relacionado a la actividad de la FA en los osteoblastos en cultivo, estos resultados originales demuestran que el CNP indujo la expresión de la FA en todos los tiempos de cultivo. De manera opuesta, el LPS y las citoquinas pro-inflamatorias como son la IL-6 y el TNF- α fueron capaces de inhibir de manera significativa la expresión de la FA, lo cual podría sugerir que estas últimas macromoléculas pueden afectar la producción de hidroxiapatita por el osteoblasto.

5.- La cuantificación del proceso de osificación “in vitro” mediante la determinación de hidroxiapatita utilizando técnicas espectrofotométricas en los osteoblastos en cultivo durante 24, 48 y 72 horas en respuesta al SFB, la IL-6, el TNF- α , el CNP y el LPS.

Uno de los retos experimentales de este trabajo consistió en determinar de manera cuantitativa, la deposición de hidroxiapatita que se observa con la tinción del Rojo de Alizarina (RA), la cual se utiliza para demostrar la presencia de calcio en el complejo de la hidroxiapatita que se deposita en los pozos de cultivo (ver Figuras 31 y 32). Esta deposición está relacionada al proceso de osificación “in vitro” que ocurre en los cultivos de osteoblastos maduros. Considerando esto, se procedió a desarrollar un método para extraer el compuesto coloreado [RA-calcio] del complejo insoluble [RA-hidroxiapatita] adherido al fondo de los pozos y luego cuantificar el [RA-calcio] de manera espectrofotométrica a 450 nm, utilizando un lector de ELISA para placas de 96 pozos. Así, se realizó una curva de calibración de hidroxiapatita (HP) en función de la absorbancia del RA a 450 nm como se muestra en la Figura 47.

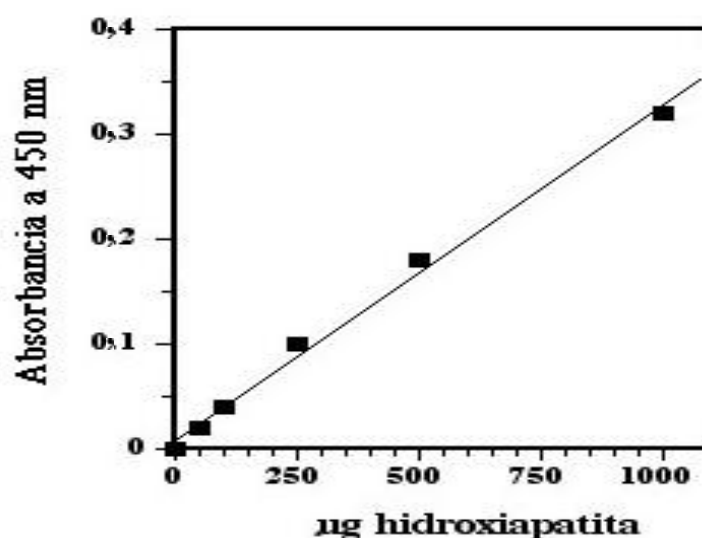


Figura 47. La curva de calibración de la hidroxiapatita. Las muestras de hidroxiapatita (50-1000 μ g) fueron colocadas en tubos Eppendorf y se les añadió 200 μ l de Rojo de Alizarina al 2%, para luego ser procesadas como fue descrito en la sección de Metodología.

Las lecturas fueron realizadas con un lector ELISA a 450 nm. Cada valor es el promedio de 3 determinaciones realizadas por duplicados.

Después de estandarizar este método original, se procedió a evaluar la deposición de HP, producto de la actividad osteoblástica, en cultivos de 24, 48 y 72 horas, en respuesta al SFB, la IL-6, el TNF- α el LPS y el CNP.

El SFB en cantidades crecientes (5 al 20%) fue capaz de inducir la deposición significativa de HP ($p < 0,05$) al 10 y 20% de SFB a las 48 y 72 h en comparación con la deposición basal (sin SFB), como se puede observar en la Figura 48.

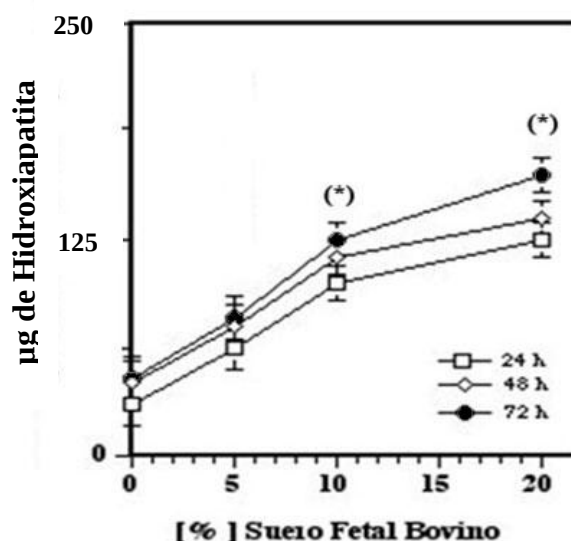


Figura 48. El efecto del Suero Fetal Bovino (SFB) en función del tiempo sobre la formación de hidroxiapatita en cultivos de osteoblastos.

Las células (1×10^4) fueron cultivadas en placas de 96 pozos y el procedimiento para la extracción del complejo RA-HP fue realizado como se describe en la Metodología. Cada punto es el promedio ($\bar{X} \pm ES$) de determinaciones ($n=5$) realizadas por duplicados. (*): $p < 0,05$ diferencia significativa entre 0 SFB y 10 y 20% SFB a las 48 y a las 72 h.

Estos resultados indican que la formación y deposición de la HP por los osteoblastos en cultivo es estimulada de manera significativa por el SFB en todas las concentraciones (5, 10 y 20%) a todos los tiempos de cultivo, siendo los valores máximos a las 72 h.

Otro aspecto evaluado, fue el efecto del CNP sobre la deposición de hidroxiapatita, por parte de los osteoblastos en cultivo. En este sentido, se encontró que a bajas concentraciones de CNP (1 nM) no se observó una deposición

significativa de HP. Sin embargo, el CNP en una forma concentración-dependiente fue capaz de inducir un aumento en la deposición de HP a 10 y 100 nM de CNP a las 24, 48 y 72 h de cultivo en comparación con la deposición basal (sin CNP), como se puede observar en la Figura 49.

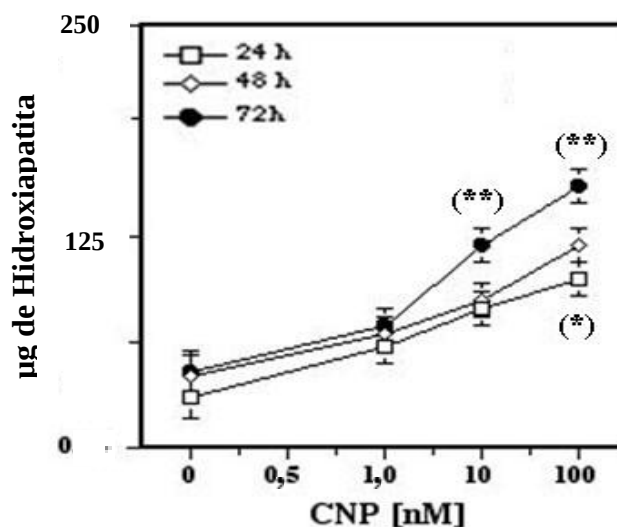


Figura 49. El efecto del péptido natriurético C (CNP) en función del tiempo sobre la formación de hidroxiapatita en cultivos de osteoblastos.

Las células (1×10^4) fueron cultivadas en placas de 96 pozos y el procedimiento para la extracción del complejo RA-HP fue realizado como se describió en la Metodología. Cada punto es el promedio ($\bar{X} \pm ES$) de determinaciones ($n=5$) realizadas por duplicados. (*): $p < 0,05$ diferencia significativa entre 0 CNP y 100 nM CNP a las 24 h. (**): $p < 0,05$ diferencia significativa entre Basal vs 10 y 100 nM CNP a las 48 y 72 h.

Por otra parte, la IL-6 fue capaz de inhibir de manera significativa ($p < 0,05$) la deposición de HP en los osteoblastos cultivados por 72 h y en la presencia de 100 ng/ml de esta citoquina. A otras concentraciones (1 y 10 ng/ml) y a las 24 y 48 h de cultivo, no se encontraron diferencias significativas, con respecto a la basal, en la deposición de HP, como se puede observar en la Figura 50.

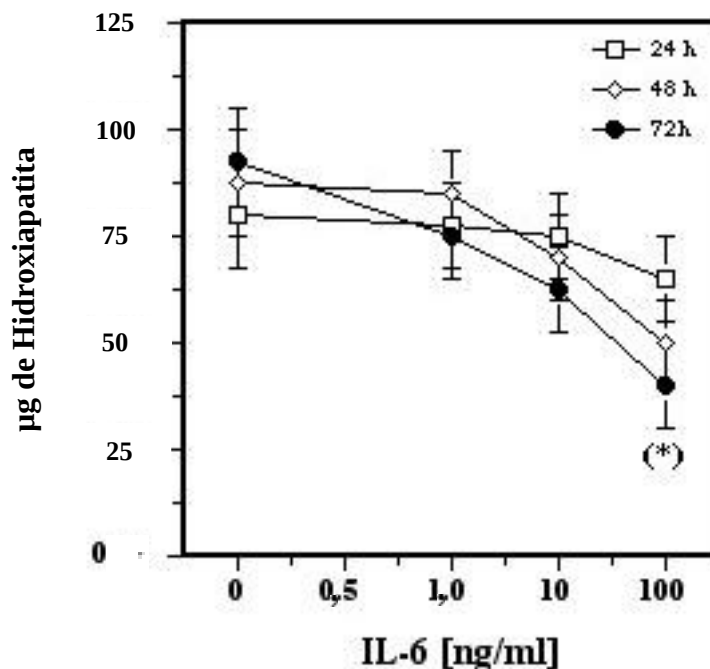


Figura 50. El efecto de la interleuquina 6 (IL-6) en función del tiempo sobre la formación de hidroxiapatita en cultivos de osteoblastos.

Las células (1×10^4) fueron cultivadas en placas de 96 pozos y el procedimiento para la extracción del complejo RA-HP fue realizado como se describe en la Metodología. Cada punto es el promedio ($\bar{X} \pm \text{ES}$) de determinaciones ($n=5$) realizadas por duplicados. (*): $p < 0,05$ diferencia significativa entre 0 y 100 ng/ml de IL-6 a las 72 h.

Así mismo, el $\text{TNF-}\alpha$ fue capaz de inhibir de manera significativa, la deposición de HP, en los osteoblastos cultivados por 24, 48 y 72 h. En los osteoblastos a las 24 h de cultivo, solo a 100ng/ml de $\text{TNF-}\alpha$, el efecto inhibitorio fue significativo. Dicho efecto fue mayor a las 48 h a las concentraciones de 10 y 100 ng/ml. El efecto inhibitorio fue más marcado en los osteoblastos incubados por 72 h y en la presencia de 1, 10 y 100 ng/ml de esta citoquina. En esta última concentración del $\text{TNF-}\alpha$, la inhibición de la actividad de la formación de HP fue cercana al 100% como se puede observar en la Figura 51.

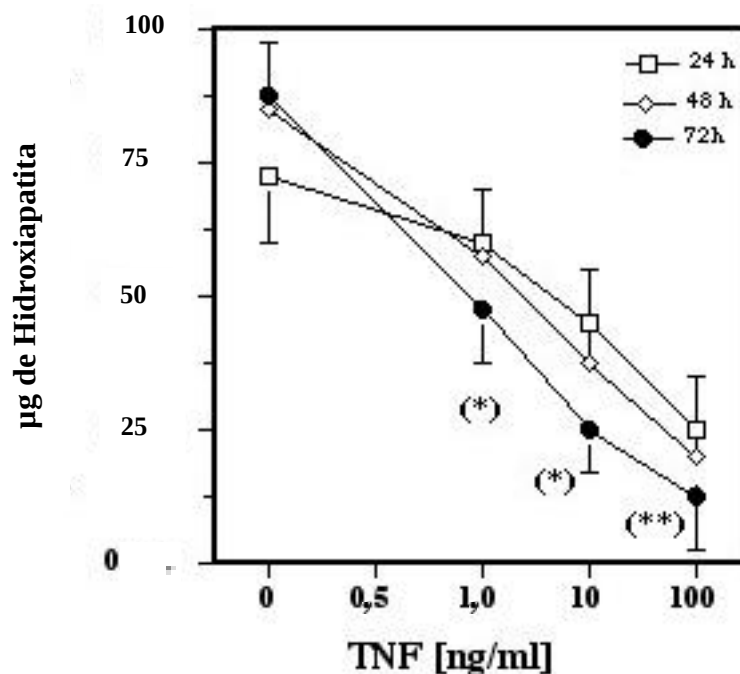


Figura 51. El efecto del TNF- α en función del tiempo sobre la formación de hidroxiapatita en cultivos de osteoblastos.

Las células (1×10^4) fueron cultivadas en placas de 96 pozos y el procedimiento para la extracción del complejo RA-HP fue realizado como se describe en la Metodología. Cada punto es el promedio ($\bar{X} \pm ES$) de determinaciones ($n=5$) realizadas por duplicados. (*): $p < 0,05$ diferencia significativa entre 0 vs 1 y 10 ng/ml de TNF- α a las 48 y las 72 h. (**): $p < 0,005$ entre 0 y 100 ng/ml de TNF- α a las 24, 48 y 72 h.

De manera similar, el LPS a todas las concentraciones fue capaz de inhibir de manera significativa, la deposición de HP en los osteoblastos cultivados por 48 y 72 h en comparación con la deposición basal. Es de hacer notar, que esta inhibición fue más marcada a la concentración de 100 ng/ml del LPS a las 72 h como se puede observar en la Figura 52.

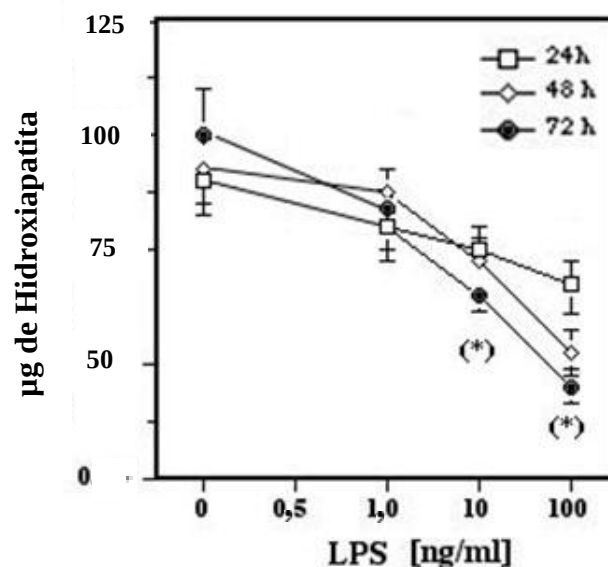


Figura 52. El efecto del lipopolisacárido (LPS) en función del tiempo sobre la formación de hidroxiapatita en cultivos de osteoblastos.

Las células (1×10^4) fueron cultivadas en placas de 96 pozos y el procedimiento para la extracción del complejo RA-HP fue realizado como se describió en la Metodología. Cada punto es el promedio ($\bar{X} \pm ES$) de determinaciones ($n=5$) realizadas por duplicados. (*): $p < 0,05$, diferencia significativa entre Basal y 10, 100 ng/ml de LPS a las 48 y 72 h.

En resumen, en relación a la deposición de hidroxiapatita, el CNP en una forma concentración-dependiente fue capaz de inducir la deposición significativa de HP a 10 y 100 nM de CNP a las 72 h en comparación con la deposición basal (sin CNP), sugiriendo que estas son las mejores condiciones donde el CNP (100nM) favorece la deposición “in vitro” de material óseo. De manera opuesta, la IL-6, el TNF- α y el LPS fueron capaces de inhibir de manera significativa la deposición de HP en los osteoblastos cultivados por 24, 48 y 72 horas, al comparar la respectiva deposición basal vs la deposición de HP a la concentración de 100 ng/ml de estas macromoléculas.

6.- La determinación de la actividad del NPR-B (receptor del CNP) presente en los osteoblastos en cultivo, mediante la cuantificación del GMPc en distintas condiciones experimentales.

A fin de poder establecer la naturaleza bioquímica del efecto del CNP en estos osteoblastos en cultivo fue necesario demostrar la existencia del receptor a este péptido natriurético como es la NPR-GC-B, enzima que produce GMPc. En este sentido, se procedió a estandarizar el método para la determinación del GMP cíclico, segundo mensajero celular, producto de la acción de esta guanililciclase sobre su sustrato que es el GTP. La concentración de GMPc fue determinada a través de un radioinmunoensayo (RIA) método que ha sido utilizado durante muchos años en la Sección de Biomembranas del IME, lugar donde se desarrolló la fase experimental de este trabajo. Dicho método ha sido desarrollado por la casa comercial Amersham, adquirida posteriormente por General Electric®. El basamento descrito en la metodología, tiene como paso inicial la realización de la curva de calibración para posteriormente poder cuantificar los niveles de GMPc en los osteoblastos en cultivo. Así, siguiendo el procedimiento descrito en el “kit” antes mencionado se realizó dicha curva de calibración, que consistió en una dilución isotópica del ^3H -GMPc con soluciones estándar de GMPc frío. Al realizar este procedimiento, se estableció que el 100% de la unión del ^3H -GMPc al anticuerpo, el cual fue desplazado al aumentar la cantidad de GMPc frío. Con estos datos experimentales se calcula un valor de Co/Cx y de este valor se puede estimar la concentración desconocida del GMPc a partir de la obtención del Co/Cx para cada muestra en estudio. Los resultados de esta curva de calibración se muestran en la Figura 53.

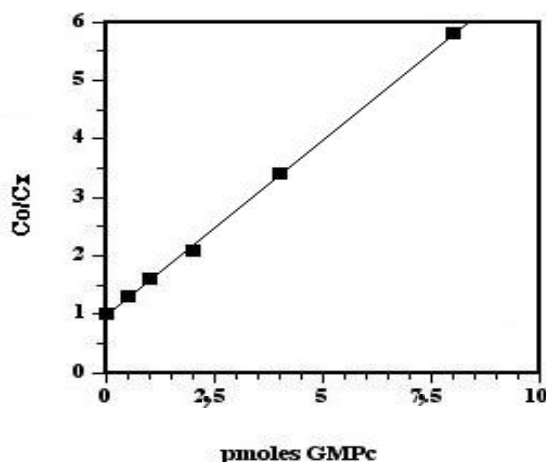


Figura 53. La curva de calibración para la determinación del GMPc utilizando la técnica del radioinmunoensayo.

Las muestras conteniendo una cantidad fija de ^3H -GMPc fueron incubadas con concentraciones crecientes (0,5 hasta 8 pmoles de GMPc frío) por 24 h a 4°C. Posteriormente las muestras fueron procesadas tal como está descrito en la metodología y los valores de Co/Cx fueron calculados y luego graficados para cada concentración de GMPc. Cada punto es el promedio de 3 determinaciones realizadas por duplicado.

Después de estandarizar, el método para la cuantificación el GMPc, se procedió a evaluar el efecto del CNP sobre los osteoblastos en cultivo. Cuando se trata de determinar los niveles intracelulares de un nucleótido cíclico, como es el GMPc, es esencial inhibir las fosfodiesterasas de los nucleótidos cíclicos (PDE) que pudiesen estar presentes. Para alcanzar esta condición experimental, se utiliza un inhibidor inespecífico de las PDEs como es el isometilbutilxantina (IMBX) a una concentración de 100µM. Este inhibidor se añade al medio de cultivo, al menos unos 5 min antes, para que penetre al interior celular y produzca la inhibición de las PDEs y posteriormente se añade el CNP. En estas condiciones experimentales, el CNP, de una manera dosis dependiente, produce un aumento de la concentración del GMPc en los osteoblastos de 48h (Figura 54) y a las 72 h (Figura 55) de cultivo. Adicionalmente, esta estimulación de la producción de GMPc por el CNP es potenciada por la pre-incubación con 100 µM IMBX, como se observa en ambas Figuras. La actividad de NPR-GC-B es ligeramente mayor en las células a 72 h pero no significativa en comparación de los cultivos de 48 h ($1,4 \pm 0,2$ pmoles-48 h vs $1,7 \pm 0,2$ pmoles GMPc-72 h).

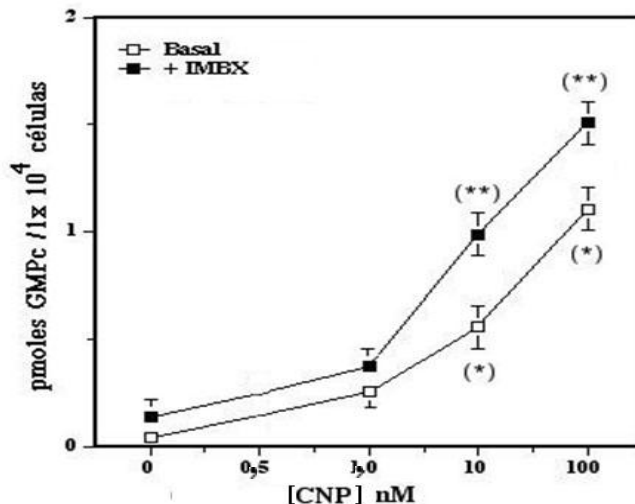


Figura 54. El efecto del CNP sobre la producción del GMPc en osteoblastos a las 48 h en cultivo. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos como se describe en la Metodología y pre-incubadas por 5 min a 37 °C con un medio que contenía un inhibidor de las PDE que es el IMBX (100 μ M). Después de este tiempo, las células fueron expuestas por 15 min a concentraciones crecientes (1-100 nM) del CNP. Posteriormente, las células fueron procesadas para la obtención de un “extracto acido-soluble” como se describe en la metodología. Los niveles de GMPc fueron estimados mediante el RIA del GMPc. Cada punto es el promedio ($X \pm ES$) de determinaciones (n=5) realizadas por duplicados (*): $p < 0,05$ diferencia significativa entre Basal vs 10,100 nM CNP. (**): $p < 0,05$ entre actividad basal vs 10,100 nM CNP en la presencia de 100 μ M IMBX.

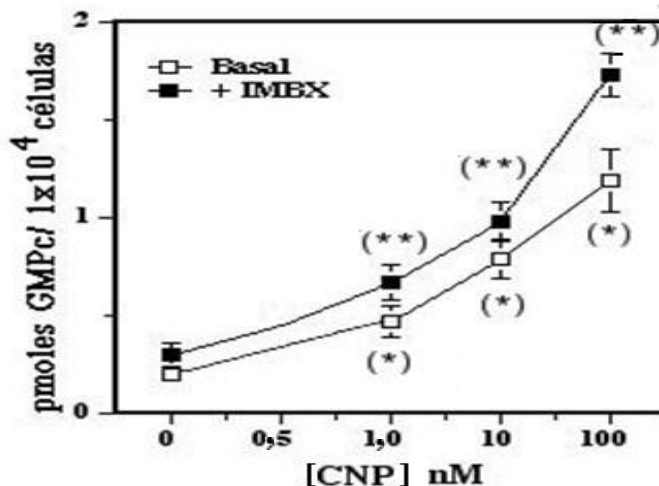


Figura 55. Efecto del CNP sobre la producción del GMPc en osteoblastos a las 72 h en cultivo. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos como se describe en la Metodología y pre-incubadas por 5 min a 37 C con un medio que contenía un inhibidor de las PDE de los nucleótidos cíclicos como es el IMBX (100 μ M). Después de este tiempo, las células fueron expuestas por 15 min a concentraciones crecientes (1-100 nM) del CNP. Posteriormente, las células fueron procesadas para la obtención de un “extracto acido-soluble” como se describe en la metodología. Los niveles de GMPc fueron estimados mediante el RIA del GMPc. Cada punto es el promedio ($X \pm ES$) de determinaciones (n=5) realizadas por duplicados (*): $p < 0,05$ diferencia significativa entre 0 CNP vs 1,10,100 nM CNP. (**): $p < 0,05$ entre actividad basal vs 1,10,100 nM CNP en la presencia de IMBX.

7.-El estudio de las interacciones entre el CNP y el LPS sobre los diversos parámetros vinculados a la actividad osteoblástica como son la proliferación celular, la actividad de la fosfatasa alcalina, la actividad de la NPR-GC y el proceso de osificación “in vitro”.

Para estudiar las interacciones entre el LPS y el CNP sobre la actividad osteoblástica y evaluar los diversos parámetros asociados a dicha actividad, se consideró que el LPS pudiese afectar la actividad metabólica de los osteoblastos, que regula la producción de NADH, lo cual puede incidir sobre los valores de absorbancia determinados por el Cell Titer. (Ver Figura 38), por lo cual era necesario utilizar otro método para determinar la proliferación de los osteoblastos, que es la determinación de proteínas celulares, como fue establecido previamente en la Figura 34.

Del análisis de los resultados experimentales previos donde se utilizó el LPS y se muestra el efecto de la proliferación de los osteoblastos (Figura 38), el efecto sobre la actividad de FA (Figura 45) y sobre la deposición de HP (Figura 52); se concluyó que el tiempo de cultivo de los osteoblastos donde ese compuesto era efectivo fue a las 48 y 72 h, lo cual coincide con las observaciones histológicas sobre la características fenotípicas de las células en cultivo (ver Figura 32), que representan a osteoblastos en maduración (48 h) o completamente maduros (72 h).

Por lo antes mencionado se decidió estudiar las interacciones entre el CNP y el LPS en osteoblastos de 48 y 72 h de cultivo. Además, la determinación de proteínas celulares fue el parámetro utilizado como medida de proliferación celular. Después de validar este método para evaluar la proliferación de los osteoblastos, se procedió a estudiar el efecto del LPS en presencia de una concentración fija de CNP (100 nM), la cual habíamos determinado previamente que producía la máxima proliferación de los osteoblastos (ver Figura 37). El LPS fue, de una manera dosis dependiente, capaz de producir una fuerte inhibición de la estimulación de la proliferación inducida por el CNP (100 nM) como se puede observar en la Figura 56.

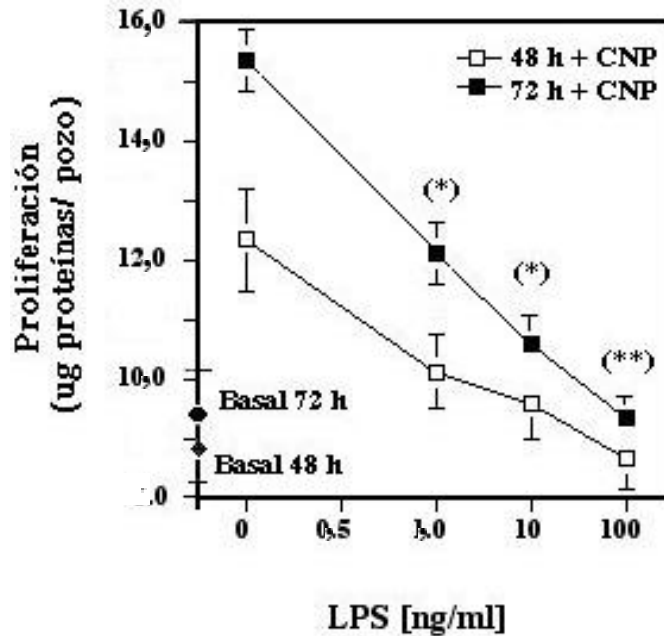


Figura 56. El efecto del LPS sobre la proliferación de los osteoblastos inducida por el CNP a 48 y 72 h en cultivo.

La proliferación fue evaluada mediante el procedimiento de la cuantificación de las proteínas totales como se describe en Métodos. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos y fueron expuestas a 100 nM CNP con diferentes concentraciones crecientes del LPS (1,10,100 ng/ml). Basal. La proliferación de osteoblastos a las 48 y 72 h. sin estímulo mitogénico. Cada punto es el promedio ($\bar{X} \pm ES$) de determinaciones ($n=5$) realizadas por duplicado. (*): $p < 0,05$ diferencia significativa entre 0 LPS vs 10 ng/ml LPS a las 48 y 72 h. (**): $p < 0,001$ entre 0 de LPS vs 100 ng/ml de LPS a las 48 y 72 h.

Estos resultados mostrados en la Figura 56 indican que el LPS a una concentración de 10 ng/ml fue capaz de inhibir la proliferación de los osteoblastos tanto a las 48 h como a las 72 h siendo mayor a inhibición a las 72 h de cultivo. El LPS a una concentración de 100 ng/ml mostró una inhibición casi completa de la proliferación de los osteoblastos, independiente de su tiempo de cultivo.

De manera adicional, utilizando los datos provenientes de los osteoblastos a 72 h de cultivo se estimó la concentración inhibitoria 50% (IC_{50}) para el LPS, la cual es de $IC_{50} = 1 \pm 0,1$ ng/ml, como la concentración capaz de inhibir en un 50%, la proliferación de los osteoblastos dependiente del CNP, como se puede observar en la Figura 57.

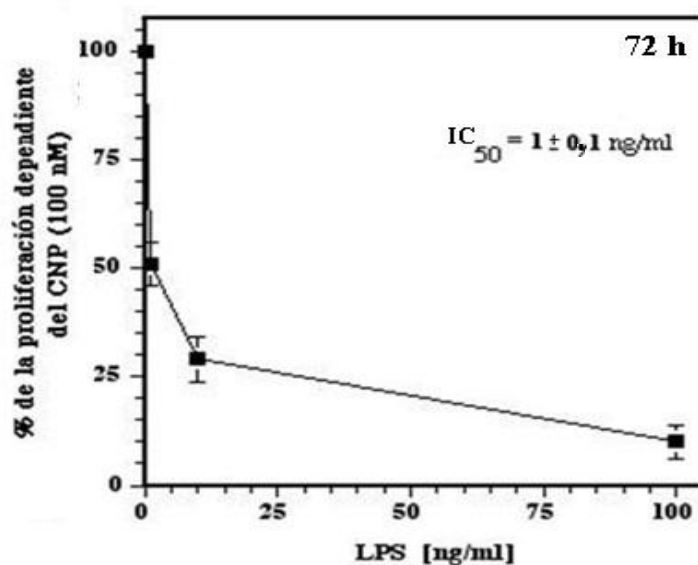


Figura 57. La estimación de la IC₅₀ para el LPS sobre la proliferación de los osteoblastos a las 72 h de cultivo.

El 100% de la proliferación fue estimada como la máxima proliferación inducida por el CNP (100 nM). Cada punto es el promedio ($\bar{X} \pm ES$) de determinaciones (n=5) realizadas por duplicado.

De igual manera, se procedió a evaluar el efecto del LPS sobre la expresión de la actividad de FA inducida por el CNP (100 nM) y se encontró que el LPS fue capaz de producir una reducción de la expresión de manera significativa ($p < 0,05$) de la actividad de FA a una concentración del 1 ng/ml de LPS y fue altamente significativa ($p < 0,005$) con una concentración de LPS de 10 y 100 ng/ml. Este marcado efecto inhibitorio del LPS sobre la actividad de la FA, fue similar en los osteoblastos a las 48h y 72 h de cultivo como se puede observar en la Figura 58. De estos ensayos experimentales se estimó una IC₅₀: $1,0 \pm 0,1$ ng/ml, la cual es la concentración del LPS capaz de inhibir en un 50%, la expresión de la FA en los osteoblastos en cultivo, independiente del tiempo de cultivo de los osteoblastos.

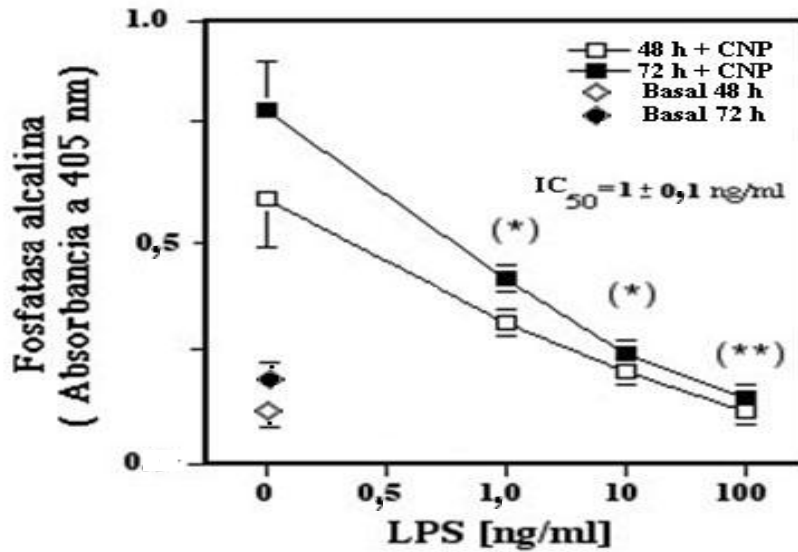


Figura 58. Efecto del LPS sobre la actividad de FA inducida por el CNP (100 nM) en osteoblastos a las 48 y 72 h de cultivo.

La actividad de FA se determinó durante 2 h midiendo la absorbancia (405 nm) en las placas de cultivo y en cada pozo a utilizando un lector ELISA. Cada punto es el promedio ($\bar{X} \pm ES$) de determinaciones ($n=5$) realizadas por duplicados. (*): $p < 0,05$ diferencia significativa entre actividad inducida por 100 nM CNP y 1 ng/ml de LPS. (**): $p < 0,005$ entre 100 nM CNP vs 10 y 100 ng/ml de LPS.

La deposición de HP estimulada por el CNP fue afectada de manera significativa por el LPS como se muestra en la Figura 59. El LPS a una concentración de 10 ng/ml fue capaz de inhibir de manera significativa la deposición de HP. Este efecto inhibitorio fue más marcado a la concentración de 100 ng/ml. Es importante mencionar que el efecto inhibitorio del LPS no dependió del periodo de tiempo del cultivo de los osteoblastos. Estos datos experimentales permitieron estimar una IC_{50} : $1,0 \pm 0,1$ ng/ml para el LPS sobre la deposición de HP inducida por el CNP por los osteoblastos.

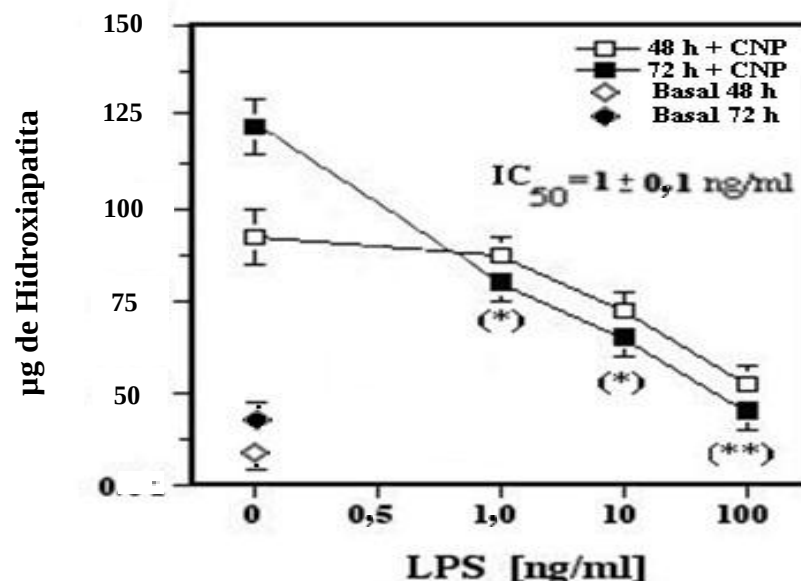


Figura 59. El efecto del LPS sobre la producción de hidroxiapatita inducida por el CNP (100 nM) en osteoblastos a las 48 y 72 h de cultivo.

Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos y el procedimiento para la extracción del complejo RA-HP fue realizado como se describe en la Metodología. Cada punto es el promedio ($\bar{X} \pm ES$) de determinaciones (n=5) realizadas por duplicados. (*): $p < 0,05$ diferencia significativa entre actividad inducida por 100 nM CNP vs 1, 10 ng/ml de LPS. (**): $p < 0,005$ entre 100 nM CNP vs 100 ng/ml de LPS a las 48 y 72 h.

De manera original en este trabajo se describe el efecto inhibitorio del LPS sobre los parámetros de la actividad osteoblástica a como son: la proliferación inducida por el CNP, así como la expresión de la actividad de la FA y finalmente sobre la deposición de HP dependiente del CNP, lo que indica que el LPS debe afectar de manera dramática la biología del osteoblasto. Para tratar de entender estos efectos inhibitorios muy significativos del LPS, se procedió a evaluar el efecto del LPS sobre la actividad de la NPR-GC-B, que es el receptor del CNP, que está presente a la membrana plasmática del osteoblasto como fue demostrado en las Figura 54 y 55 En estas condiciones experimentales se evaluó el efecto del LPS sobre la activación de la NPR GC-B por el CNP (100 nM) y se encontró que el LPS a bajas concentraciones como 1 y 10 ng/ml produjo una inhibición marcada de esta enzima siendo, la inhibición casi total, a los 100 ng/ml de LPS. Este efecto inhibitorio sobre la NPR-GC-B, fue similar en los osteoblastos a las 48 h como se muestra en la

Figura 60 y en los osteoblastos a las 72 h de cultivo como se puede observar en la Figura 61. En ambos grupos de ensayos se estimó una IC_{50} : $1 \pm 0,1$ ng/ml para el LPS como la cantidad capaz de inhibir un 50% de la actividad de la NPR-GC-B presente en los osteoblastos en cultivo, la cual resultó ser idéntica en ambos grupos de experimentos.

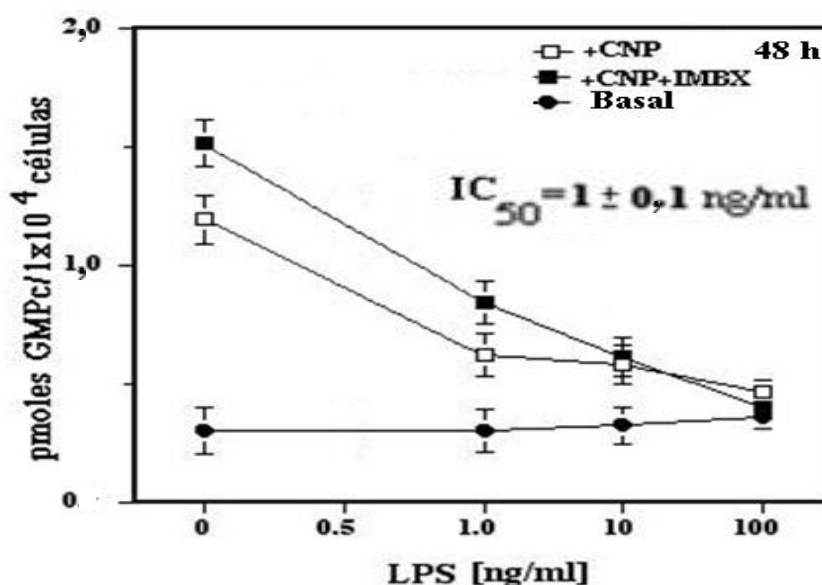


Figura 60. El efecto del LPS sobre la producción del GMPC dependiente del CNP en osteoblastos a las 48 h en cultivo

Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos como se describe en la Metodología y fueron pre-incubadas por 5 min a 37 C con un medio que contenía IMBX (100 μ M). Después de este tiempo, las células fueron expuestas por 15 min a concentraciones crecientes (1-100 nM) del CNP. Posteriormente, las células fueron procesadas para la obtención de un “extracto ácido-soluble” como se describe en la metodología. Los niveles de GMPC fueron estimados mediante el RIA del GMPC. Cada punto es el promedio ($\bar{X} \pm ES$) de determinaciones (n=5) realizadas por duplicados (*): $p < 0,05$ diferencia significativa entre 0 CNP vs 10,100 nM CNP. (**): $p < 0,05$ entre actividad basal vs 100 μ M IMBX.

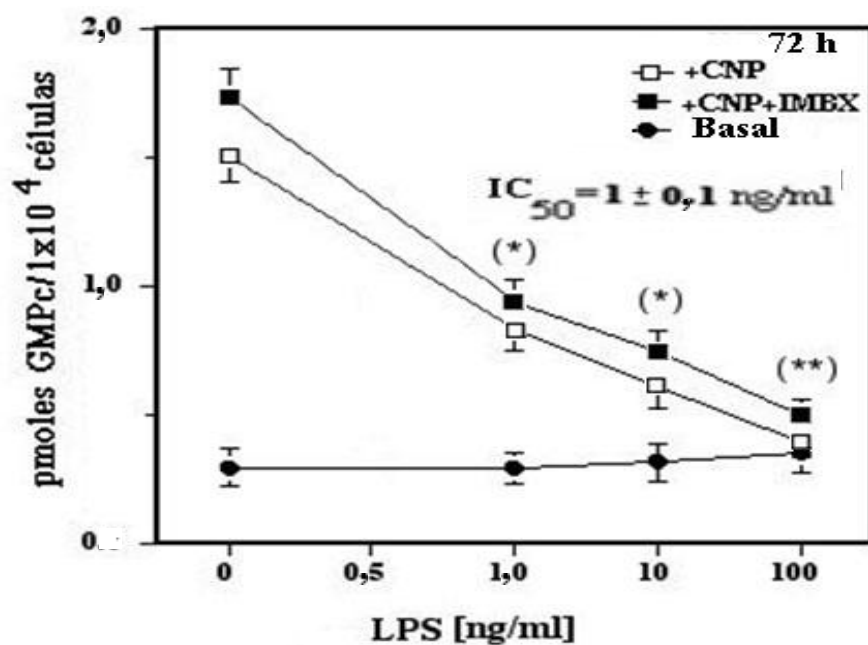


Figura 61. El efecto del LPS sobre la producción del GMPC dependiente del CNP en osteoblastos a las 72 h en cultivo.

Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos como se describe en la Metodología y fueron pre-incubadas por 5 min a 37 C con un medio que contenía IMBX (100 μ M). Después de este tiempo, las células fueron expuestas por 15 min a concentraciones crecientes (1-100 nM) del CNP. Posteriormente, las células fueron procesadas para la obtención de un "extracto acido-soluble, como se describe en la metodología. Los niveles de GMPC fueron estimados mediante el RIA del GMPC. Cada punto es el promedio ($\bar{X} \pm ES$) de determinaciones (n=5) realizadas por duplicados (*): $p < 0,05$ diferencia significativa entre 0 CNP vs 10,100 nM CNP. (**): $p < 0,05$ entre actividad basal vs 100 μ M IMBX.

DISCUSION

En el desarrollo de esta Tesis Doctoral, hemos planteado entender que ocurre con los osteoblastos presentes en el área de la osteólisis peri-implante, zona donde existe un proceso inflamatorio crónico, que se genera en el tejido óseo circundante a las prótesis utilizadas en la cirugía traumatológica (195). En dichos implantes puede estar presente el LPS, aun en la ausencia de bacterias, como es el caso de los aflojamientos asépticos, que pueden conducir a la osteólisis y posterior alteración de la prótesis y pérdida de dicho implante. Adicionalmente, revisamos los factores que son capaces de estimular el crecimiento y la diferenciación de los osteoblastos, en especial, el CNP que es un inductor de la formación de hueso a nivel de la placa de crecimiento (196).

Por lo anterior, en este proyecto de Tesis Doctoral se procedió a estudiar el efecto del CNP sobre la proliferación de osteoblastos en cultivo, obtenidos de calvaria de ratas neonatales Sprague Dawley, en la presencia del LPS como una manera de aproximación a los mecanismos moleculares y celulares del osteoblasto que pudiesen ser desencadenados por infecciones o sus productos bacterianos como es el LPS. Hasta la fecha no se ha descrito cual es el comportamiento de los osteoblastos en cultivo que son expuestos de manera simultánea al CNP y al LPS, lo cual convierte a este proyecto en un trabajo original.

1.- Establecimiento de las condiciones de aislamiento y cultivo primario de osteoblastos a partir de calvaria de ratas Sprague Dawley

Inicialmente para la realización de la fase experimental de este proyecto fue necesario decidir cuál era el modelo de proliferación de osteoblastos, conveniente para nuestros estudios. Así se han descrito diversos sistemas de cultivo de osteoblastos que utilizan muestras provenientes de humanos (197), gatos (198), perros (199).y ratas (179), que son las especies más utilizadas. En nuestro caso, no evaluamos muestras de hueso de neonatos humanos (mortinatos), de donde es posible extraer células que se diferencien a osteoblastos, debido a la dificultad médico-legal para obtener dicho material biológico. El caso de otros mamíferos como son los perros y gatos fueron excluidos, en función de no contar con un Bioterio

adecuado, para la cría de dichos animales y se decidió utilizar la rata de la especie Sprague-Dawley por ser un biomodelo que existe en el IME y que es de fácil controlar su crecimiento y su reproducción. Adicionalmente, la calvaria de rata es el material biológico más utilizado para los estudios de la biología celular y molecular del osteoblasto (179,200). Teniendo en consideración, los elementos logísticos antes mencionados, se decidió proceder a establecer las condiciones de aislamiento y cultivo primario de osteoblastos a partir de calvaria de ratas Sprague Dawley.

El cultivo de los osteoblastos de calvaria de rata empleando colagenasa como enzima proteolítica de digestión, fue iniciado en 1964 por Peck y col en (201); el cual fue modificado y mejorado por Wong y Cohen en 1974 (202). Estos fueron los trabajos iniciales que condujeron al desarrollo del método descrito por Isabel R y col (179), y que fue el empleado en este trabajo.

Este método de aislamiento y cultivo se caracteriza por:

- 1.- Un alto rendimiento de osteoblastos por calvaria, con una elevada actividad de fosfatasa alcalina y capacidad para la formación de matriz ósea y mineralización mediante la formación de nódulos.
- 2.- Permitir estudiar los osteoblastos en un ambiente controlado de pH, CO₂, O₂, en un medio de composición conocida de nutrientes, y en la ausencia de otras células que están en el hueso, como son las células endoteliales, fibroblastos, osteoclastos, células nerviosas y células hematopoyéticas.

Este método de aislamiento y cultivo de osteoblastos fue implementado por primera vez en la Sección de Biomembranas del IME por las siguientes razones técnicas:

La viabilidad de este proyecto estuvo garantizada por la disponibilidad de los reactivos, las ratas e infraestructura para el cultivo de células del IME. Además por poseer la experiencia sobre el cultivo de células de mamíferos en dicha sección.

Es importante resaltar que la maduración de los osteoblastos es un proceso complejo, por lo que el medio de cultivo, los suplementos celulares y de soporte de los osteoblastos deben ser muy bien definidos, en experimentos preliminares, para alcanzar una diferenciación óptima como ha sido enfatizado de manera reciente (203).

Para la realización de nuestros cultivos se definieron varios parámetros:

1.- La duración de los cultivos fue establecida, considerando los parámetros típicos de los osteoblastos, como son la presencia de la actividad de la fosfatasa alcalina (FA) y la capacidad para la deposición de hidroxipapatita (HP) (204). y utilizando estos criterios demostramos que las células provenientes de la calvaria de rata se diferencian en 3 días a osteoblastos maduros. Este corto período de cultivo fue una ventaja técnica para evitar las dañinas contaminaciones bacterianas y micóticas que afectaron los cultivos de larga estadía, que fue observado en cultivos de más de 7 días, a pesar de cambio de medio inter-diario y adición de antibióticos y antimicóticos (resultados no mostrados).

2.- La edad de las ratas neonatales. Los osteoblastos se aislaron a partir de calvaria de ratas neonatas (Sprague-Dawley) de 2-3 días de nacidas como antes mencionado (131). Es importante resaltar que se realizaron cultivos preliminares con calvaria de mayor edad (> de 5 días de nacidas) y se encontró que el rendimiento de osteoblastos se redujo de manera significativa (datos no mostrados).

Las calvarias fueron aisladas de los tejidos blandos circundantes como se puede observar en la Figura 25 A y B. Posteriormente fueron diseccionadas bajo condiciones asépticas (Figura 25 C), por lo cual todo el material utilizado fue estéril para evitar las contaminaciones de bacterias y hongos. Con respecto a la contaminación de los cultivos celulares, este es uno de los problemas que ocurre con mayor frecuencia y que genera una mayor pérdida de material y tiempo. Por lo tanto, las condiciones que aseguren la esterilidad de todo aquel material que entre en contacto con los cultivos celulares son indispensables, ya que el LPS es un producto bacteriano y si se quiere evaluar dicho compuesto, todo tipo de contaminación bacteriana en especial, la ausencia de las bacterias gran negativas debe estar garantizada. Como medidas para prevenir las contaminaciones de los cultivos celulares por microorganismos se utiliza la campana de flujo laminar, la cual fue limpiada antes y después de cada uso con soluciones antisépticas como Gerdex® o Cidex® y etanol al 70%. Por otra parte, el material de vidrio y de metal se esteriliza con autoclave y los medios de cultivos fueron filtrados bajo vacío en la campana de

flujo laminar utilizando filtros Millipore estéril de 0,22 μm . Además, los medios de cultivo contenían antibióticos (100 U/ml penicilina y 100 mg/ml estreptomicina).

La contaminación puede observarse macroscópicamente al momento de la inspección del medio de cultivo en los frascos, así como también, la coloración del mismo medio como medida cualitativa del pH (un medio de color amarillo indica acidez del medio y el color lila-morado indica un medio básico) y la turbidez del medio, como posible indicador de contaminación biológica.

Los frascos de cultivo o las placas conteniendo células se evaluaron cada 24 h, iniciando con una revisión general de las condiciones de incubación de las células. La evaluación macroscópica comprendió la inspección del medio contenido en los frascos o placas para visualizar cualquier contaminación. Inmediatamente se evaluaron los frascos o placas de cultivo al microscopio óptico, observando la presencia de células adheridas al fondo de la placa, la morfología de las células adheridas (forma, tamaño, granulaciones citoplasmáticas, presencia de vacuolas en el citoplasma, relación con las células vecinas, entre otros). Además se realizó un estimado porcentual de la confluencia celular. Finalmente, se efectuó una observación exhaustiva para descartar cualquier posible contaminación por agentes microbianos, como fue discutido anteriormente, así como la cantidad de detritos, material orgánico o células posiblemente apoptóticas. Cuando los frascos del cultivo mostraron evidencias de contaminación bacteriana antes descritas, fueron eliminados de inmediato y excluidos de los grupos en estudio.

Se debe enfatizar, la necesidad del SFB en las etapas iniciales del cultivo, al menos 20%, para lograr un cultivo vigoroso y de crecimiento rápido de las células y así evitar una escasa confluencia celular en los frascos de cultivo.

También fue crucial, el empleo de frascos de cultivo (T75 y T25) y sembrar a una densidad celular promedio de 1×10^6 células, para alcanzar el éxito de los cultivos. El cultivo celular se incubó a 37 °C en atmósfera húmeda y 5% CO_2 . El medio fue cambiado a las 24 h de cultivo, a fin de descartar las células muertas y no adheridas, considerando que las células de nuestro interés son aquellas que permanecen adheridas al fondo de las placas o frascos de cultivo.

En las condiciones experimentales antes descritas y utilizadas en este trabajo, la población celular alcanzó aproximadamente un 15 % de confluencia de cultivo, a las 24 h, lo que indica un buen rendimiento de aislamiento de células adherentes como se observa en la Figura 26 A y B. Después, de haber transcurrido 48 h de cultivo, éstas mostraron un 50% de confluencia como se observa en la Figura 27 A y B, alcanzando entre un 90 al 98 % de confluencia, a las 72 h de cultivo como se puede observar en la Figura 28 A y B. Cuando se alcanza este punto de confluencia máxima es preciso realizar pasajes, a fin de expandir la población celular, y de esta manera tener una población celular osteoblástica homogénea.

Los osteoblastos fueron observados al microscopio de luz, previa tinción con hematoxilina-eosina, utilizando células en confluencia máxima (90-98%) (72 h) y baja confluencia (24 y 48 h).

2.- La caracterización del fenotipo de la población celular de los osteoblastos en cultivo mediante la tinción de Hematoxilina/eosina y rojo de alizarina

Los osteoblastos en cultivo provenientes de calvaria de rata fueron fijadas y procesadas para realizar la coloración clásica de Hematoxilina-Eosina (H/E), a fin de caracterizar su fenotipo celular, pudiéndose observar que a las 24 h de cultivo, estas células presentan un fenotipo de osteoblastos inmaduros como se observa en la Figura 29 A, es decir: son células fusiformes con un núcleo central y en algunas se observa más de un nucléolo, producto de su división celular (205). La población celular es muy heterogénea, en esta etapa del aislamiento, por lo que pueden estar presentes otros tipos de células con este mismo fenotipo como son los fibroblastos. (206,207) Estas células contaminantes desaparecen a medida que se realizan los cambios de medio y se ve favorecida la proliferación de las células osteoblásticas y su ulterior maduración, en función de las características específicas del medio de cultivo.

Estas células osteoblásticas presentan inhibición por contacto agrupándose en la placa de cultivo de manera organizada y formando una monocapa confluyente al cabo de 72 h de cultivo. De manera característica, el núcleo de estas células se sitúa en el extremo que se halla más alejado de la superficie donde se asientan. Los

osteoblastos maduros son células de forma cúbica, presentan un citoplasma basófilo y se observa la presencia de pseudópodos como se puede observar en la Figura 29 B (207).

La tinción con Rojo de alizarina (RA) ha sido utilizada durante décadas para evaluar los depósitos ricos en calcio de las células en cultivo, en especialmente en los osteoblastos (208,209). El RA es especialmente versátil y exclusivo para evaluar la deposición de calcio en la matriz ósea por desarrollar un intenso color rojo-fluorescente que permite determinar cualitativamente, si ocurre deposición de calcio, en los cultivos y en este trabajo se utilizó el procedimiento descrito por Cao y col (190). El rojo de Alizarina (sódica sal del ácido 3,4-Dihidroxi-9,10-dioxo-2-antraceno sulfónico) es un derivado de la antraquinona, que se utiliza para identificar calcio en secciones de tejido. El calcio forma un complejo con el rojo de alizarina S-calcio en un proceso de quelación, como se muestra en la Figura 62 y el producto final es birrefringente.

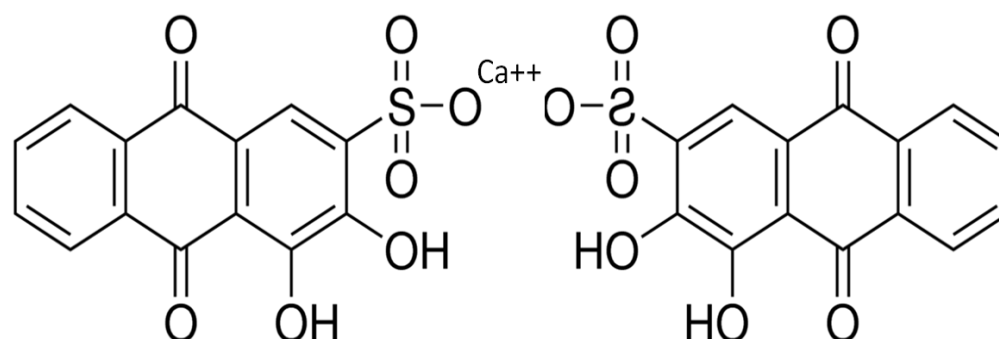


Figura 62. Alizarina El rojo de Alizarina S. se utiliza para identificar calcio en secciones de tejido, mediante un proceso de quelación

Esta tinción se llevó a cabo en cada uno de los pasajes de las células a fin evaluar la maduración de dichas células. Las células a partir de las 72 h de cultivo presentan una coloración intensa frente al rojo de Alizarina en forma de gránulos de depósitos del calcio (hidroxipatita) en el interior de dichas células (210), posiblemente a nivel mitocondrial (211) lo cual confirma la naturaleza celular de osteoblasto, ya que son las únicas células que producen dichos depósitos intracelulares del tipo HP (Figura 31). Resultados similares en osteoblastos aislados de calvaria de rata han sido previamente descritos (212). Además, este tipo de comportamiento celular de

crecimiento rápido ha sido descrito en cultivos de células de osteoblastos humanos (MG63), las cuales se tiñen con rojo de alizarina a los 2-3 días de cultivo observándose también nódulos teñidos con RA (213). En las células en cultivo a las 24 h, la tinción con rojo de alizarina al 2% demuestra que dichos depósitos intracelulares no están presentes en estas células, lo que sugiere que son células inmaduras (Figura 30).

La evaluación de la maduración de los osteoblastos durante el periodo de cultivo celular.

El proceso de maduración de los osteoblastos en cultivo bajo las condiciones descritas en la Metodología se resume en la Figura 32. En la primera sección de dicha Figura 32 se observa como el cultivo de osteoblastos cambia desde un 15% de confluencia hasta un 95-98 % de confluencia a las 72 h.

El segmento intermedio de la Figura 32 es la tinción con H/E. Las células en cultivo de osteoblastos a las 24 h de cultivo presentan un fenotipo de osteoblastos inmaduros, es decir: son células fusiformes con un núcleo central y en algunas se observa más de un nucléolo como se observa en la Figura 29. Posteriormente cuando el tiempo de cultivo progresa estas células presentan inhibición por contacto organizándose en la placa de cultivo formando una monocapa confluyente al cabo de 72 h de cultivo. Los osteoblastos maduros son células de aspecto cúbica, presentan un citoplasma basófilo y se observa la presencia de pseudópodos (Figura 29).

En el tercer segmento de la Figura 32 ilustra la tinción con el rojo de alizarina para la determinación cualitativa de los depósitos de calcio asociados a la HP, que es una actividad característica del osteoblasto maduro. Así, a las 24 horas de cultivo donde se observa una confluencia de 15% y utilizando la tinción con rojo de Alizarina no se evidencian la formación de nódulos de mineralización. Al estar estas células en cultivo a las 48 h hay una mayor confluencia 50%, las células van modificando su morfología pero no se observó una tinción significativa con rojo de alizarina de los depósitos de calcio. Sin embargo, transcurrido 72 h de cultivo observamos una mayor confluencia 90-98% y se evidencia un cambio morfológico y con la formación

de nódulos de mineralización (material adherido a la placa y teñido de rojo). Además esta formación de nódulos de osificación y depósitos de calcio están asociadas a una alta actividad de la fosfatasa alcalina (marcador bioquímico de los osteoblastos maduros), actividad enzimática que se cuantificó en estas células en cultivo.

Uno de los aspectos técnicos más relevantes de este trabajo fue tratar de utilizar las mismas placas de 96 pozos de cultivo de osteoblastos para obtener de ellos la mayor información posible en función de los siguientes elementos: La proliferación celular, la determinación de la actividad de FA, la cuantificación de proteínas celulares totales y la determinación de HP fueron realizadas en la misma placa de 96 pozos por razones económicas y de esta manera utilizar al máximo cada cultivo celular. También reducir la variabilidad que pudiesen existir al comparar diferentes aislamientos de células y cultivos.

Esta metodología original consistió en que los procedimientos fueron realizados de manera secuencial como se describe a continuación:

1. La determinación de la proliferación celular mediante el empleo del método MTS-PMS. El sobrenadante proveniente del ensayo MTS-PMS fue descartado y los pozos fueron cuidadosamente lavados y luego se procedió a la solubilización de las proteínas celulares utilizando Triton X-100 y con ello la extracción de la actividad de fosfatasa alcalina como se ha descrito en la Sección de Métodos.
2. El extracto anterior fue utilizado para la determinación de la fosfatasa alcalina (FA), como un marcador de la actividad osteoblástica como se ha escrito en la Sección de Métodos.
3. Al finalizar el ensayo de la FA, el material obtenido de al menos (3) pozos de dicho ensayo enzimático fueron mezclados en la forma de un “pool” para proceder a la determinación de proteínas de las células en cultivo como se ha escrito en la Sección de Métodos.
4. Finalmente, el material insoluble y adherido a la placa fue lavado y se procedió a realizar la tinción con RA y la ulterior extracción del complejo

[Ca²⁺-RA] para la determinación espectrofotométrica cuantitativa de HP , parámetro indicativo del proceso de osificación en la misma placa de 96 pozos.

En el caso de los experimentos realizados para la determinación de la actividad de Guanililciclase activada por el CNP (NPR-GC-B) mediante la cuantificación del GMPc, el empleo del ácido tricloroacético (ATC) para la extracción de los nucleótidos ácido- solubles no permitió realizar ningún tipo adicional de análisis bioquímico o químico.

3.- La proliferación basal en los osteoblastos en cultivo durante 24, 48 y 72 horas y en respuesta al SFB, la IL6, al TNF- α , el CNP y al LPS.

La medida de la proliferación celular refleja el cambio en el número de células durante un periodo de tiempo. La forma de la curva de crecimiento es característica de cada tipo celular y permite obtener el tiempo de duplicación celular, que es el tiempo que tarda el cultivo en duplicar el número de células durante la fase exponencial. Al principio del cultivo, las células pasan por un periodo de latencia hasta las 4 h (fase “lag”) en el que no se dividen, debido a que se encuentran en un período de adaptación. Una vez concluido este periodo, las células empiezan a proliferar de una forma exponencial 24-48 h (fase “log”) hasta que dejan de dividirse al llegar a la confluencia del cultivo a las 72 h. En esta última fase que se denomina estacionaria o “plateau” se da una inhibición del crecimiento por contacto-célula-célula en función de la alta densidad celular (214).

La actividad de proliferación celular en los osteoblastos de rata en cultivo fue estudiada mediante la exposición a un conjunto de agentes mitogénicos y anti-mitogénicos. La manera clásica de medir proliferación celular es la incorporación de [³H] Timidina al ADN celular (215), la cual fue inviable, en los actuales momentos. Otra manera es cuantificar, el aumento en el contenido de ADN celular, como una expresión de la dicha proliferación utilizando compuestos que se unen al ADN y fluorescen como el bromuro de etidio, el cual permite la cuantificación del ADN mediante la fluorescencia proveniente de geles de agarosa (216). Esta técnica es laboriosa y costosa. Por lo anterior se utilizó el método de MTS-PMS, el cual

depende de la intensa actividad mitocondrial y el contenido de NADH vinculado al metabolismo celular estimulado por la división celular y es un procedimiento sencillo y asequible. Inicialmente con el método MTS-PMS previamente estandarizado se evaluó el efecto del SFB, el cual fue capaz de incrementar la proliferación celular de manera significativa (10, 20% SFB) y a todos los tiempos de cultivo (24, 48 y 72 h). Estos resultados mostraron que el aumento en la proliferación celular fue lineal con SFB al 5, 10 % en osteoblastos a las 24, 48 y 72 h de cultivo. Sin embargo, esta linealidad no fue observada a 20% de SFB como se muestra en la Figura 33. Algunos anti-mitogenos pueden afectar la actividad mitocondrial o el metabolismo celular y cabe señalar que la reducción del MTS es un marcador que refleja el metabolismo de las células viables y no específicamente la proliferación celular. Los ensayos de reducción del tetrazolio a menudo son erróneamente descritos como medir la proliferación celular sin el uso de controles adecuados para confirmar los efectos sobre el metabolismo (217). Por lo anterior, se decidió medir la proliferación celular determinando el aumento en la concentración de proteínas totales y correlacionarlo con el método MTS-PMS para garantizar la confiabilidad de ambos métodos. En este sentido se evaluó el efecto del SFB sobre el contenido de las proteínas totales y se puede observar en la Figura 34 que la proliferación celular se incrementó, en función del tiempo, y de manera lineal en todas las concentraciones del SFB, siendo significativa desde el 5% alcanzando el máximo valor al 20% SFB. Estas 2 metodologías para evaluar la proliferación celular coinciden en la dependencia del tiempo y de la concentración del SFB en inducir la proliferación celular, aunque la cinética al 20% SFB no parece ser igual en ambos métodos. Una posible explicación para esta discrepancia puede ser debida que al 20% de SFB, la cantidad de NADH sea tan grande que sobrepase el rango de apreciación del método MTS-PMS. Estas discrepancias existentes quedan para futuras investigaciones en este campo.

Para poder evaluar los efectos sobre la proliferación celular del CNP y el LPS, motivo de estudio de este trabajo experimental, fue necesario demostrar que los osteoblastos en cultivo utilizados eran capaces de responder a otros estímulos clásicos que son las citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- α y la IL-6.

De manera interesante, bajo las condiciones experimentales empleadas en este trabajo, la IL-6 a 1 ng/ml estimuló la proliferación de los osteoblastos, pero al incrementar la concentración de esta interleuquina a 10 ng/ml se inhibió la proliferación celular, siendo mayor dicha inhibición a 100 ng/ml de IL-6 como se puede observar en la Figura 35. Estos resultados paradójicos de esta citoquina sobre la proliferación osteoblástica han sido descritos en otros sistemas. Estudios de transducción de señal demostraron que la IL-6 activa vías de señalización importantes para regular la diferenciación de osteoblastos. Sin embargo, el papel de IL-6 en osteoblastogénesis sigue siendo polémico, ya que han sido descritos efectos tanto inhibitorios como estimuladores de la osteoblastogénesis (218-220).

Resultados similares fueron observados en el caso de la otra citoquina pro-inflamatoria como es el TNF- α pero la estimulación a 1 ng/ml fue menor para el TNF- α en comparación con la IL-6 pero el efecto inhibitorio del TNF- α sobre la proliferación de los osteoblastos fue mayor al incrementar las concentraciones de esta citoquina. Además, se observó que el efecto inhibitorio sobre la proliferación de ambas citoquinas era mayor al aumentar el tiempo de cultivo, siendo más pronunciado a las 72 h, en relación a la 24 h, como se puede observar en la Figura 35 y 36. Es bien conocido que el TNF- α es capaz de disminuir la formación osteoblástica del hueso a través de la supresión de la proliferación de osteoblastos, (221), la inducción de la apoptosis de osteoblastos (222) y la inhibición de la diferenciación de osteoblastos (177,178, 223). Los resultados encontrados en este trabajo consolidan el hecho que el TNF- α es una poderosa citoquina anti-osteoblastogénica, como ha sido demostrado por otros investigadores (177,178 221-223).

Después de demostrar que los osteoblastos en cultivos eran capaces de reproducir las respuestas biológicas que inducen el SFB, la IL-6 y el TNF- α , procedimos a evaluar el efecto sobre la proliferación de los osteoblastos en cultivo del péptido natriurético C (CNP) y del Lipopolisacarido (LPS), sustancias que son los motivos de esta investigación.

El CNP fue capaz de inducir una estimulación sostenida de la proliferación de los osteoblastos de una forma dosis-dependiente del CNP, y que esta estimulación

aumentaba en el transcurso del tiempo de cultivo de los osteoblastos en estudio observándose los mayores valores a una concentración de 100 nM CNP y dicha estimulación de la proliferación fue mayor a las 72 h de cultivo. En relación a la proliferación de los osteoblastos, el CNP a 1 nM CNP fue capaz de estimularla en 3 veces, siendo la estimulación de 5 veces a 10nM CNP, alcanzando su valor máximo de 5,6 veces a 100 nM CNP. Estos resultados se muestran en la Figura 37.

Estos hallazgos experimentales sustentan la hipótesis que el CNP es importante en la formación de hueso a nivel endocondreal (72,76,224). Nuestros resultados coinciden con los trabajos descritos donde demuestran que el péptido natriurético (CNP) afecta la proliferación y diferenciación de células osteoblásticas de calvaria de rata (72). Recientemente, Kondo y col (225) han demostrado en ratones “mutados” que poseen una elevada concentración de CNP plasmático, son capaces de acelerar la resolución de fracturas óseas en comparación con el ratón normal. Además muestran que los receptores para el CNP (NPR.GC-B) se encuentran aumentados en el “callo” de la fractura. Estos resultados “in vivo” están en concordancia con nuestros hallazgos experimentales “in vitro” donde el CNP aumenta la proliferación de los osteoblastos de rata de manera dosis dependiente. Toda esta información permite sustentar el hecho que el CNP participa en el remodelaje del hueso y acelera la formación del “callo” y la resolución de la fractura, como se discute en este trabajo.

El LPS fue capaz de inducir una inhibición de la proliferación de los osteoblastos, efecto inhibitorio que fue significativo a las 48 y 72 h de incubación de las células en cultivo en presencia de 100 ng/ml LPS como se puede observar en la Figura 38. Estas observaciones descritas en este trabajo coinciden con los hallazgos reportados sobre el efecto inhibitorio del LPS en la diferenciación de células osteoblásticas (158, 226). Adicionalmente, Liu y col. (227) han demostrado que el LPS actúa a través del TLR4 suprimiendo la expresión de los genes marcadores osteogénicos como RUNX2 y osteocalcina (OCN) que son factores esenciales que afectan a la diferenciación de osteoblastos y la formación ósea. El LPS, parece ejercer su efecto anti-osteoblástico, vía la activación de las cascadas de las MAPK, al promover la fosforilación de la JNK en células MC3T3-E1. Así, el LPS puede inducir

apoptosis de osteoblastos e inhibir la diferenciación de los mismos a través de la activación de la cascada de señalización vinculada a la proteína quinasa tipo JNK (228). Es factible que el LPS induzca la apoptosis de los osteoblastos de rata en cultivo, lo cual puede explicar la fuerte inhibición de este producto de la pared bacteriana sobre la proliferación y la diferenciación de los osteoblastos.

En la grafica resumen (Figura 39) sobre la actividad de la proliferación osteoblástica de rata se muestra que el SFB al 20% estimuló de manera significativa la proliferación en 1,8 veces mientras que el CNP (100 nM) estimuló en más de 2,8 veces siendo este péptido natriurético, el mayor estimulador de la proliferación de los osteoblastos en cultivo. Adicionalmente se observa que el LPS, la IL-6, y el TNF- α inhibieron de manera significativa dicha proliferación basal en un rango del 30% (IL-6, y TNF- α) hasta un 40 % (LPS).

4.-La determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina en los osteoblastos en cultivo durante 24, 48 y 72 horas y en presencia del SFB, la IL-6 y el TNF α , el CNP y el LPS.

La actividad, así como la expresión de la FA se considera un marcador de los osteoblastos maduros y están asociados con los procesos de la mineralización de la matriz ósea. La determinación de la actividad de la FA es una manera indirecta de evaluar la capacidad del osteoblasto para producir hidroxapatita (209). Este es un compuesto inorgánico de calcio/fosfato, cuya formación representa el paso inicial para el proceso de osificación. La hidroxapatita está formado por fosfato de calcio cristalino ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$); a veces formulado como $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

Para poder determinar la actividad de una enzima en medios de cultivos, es necesario establecer previamente la proporcionalidad entre la actividad enzimática, en este caso, la actividad de la FA y la cantidad de proteínas celulares. La proporcionalidad entre la actividad de FA y la cantidad de proteínas celulares fue establecida mediante una curva de calibración como se puede observar en la Figura 40. La actividad de la FA se determinó mediante la liberación del p-Nitrofenol (Absorbancia a 405 nm) a partir del p-Nitrofenilfosfato como sustrato. Además, se

demostró que la actividad de FA fue lineal hasta las 2 h a 37 °C como se puede observar en la figura 41.

En función de los parámetros previamente establecidos, la actividad de la FA fue determinada a las 2 h a 37 °C y utilizando un rango entre 20 - 80 µg de proteínas celulares.

Después de estandarizar la determinación de la actividad de la FA, se procedió a cuantificar la actividad de la FA en cultivos de osteoblastos que fueron expuestos a concentraciones crecientes del SFB con son al 5, 10 y 20% y a diferentes tiempos de cultivo (24, 48 y 72 h). La actividad de FA se incrementó al aumentar la concentración del SFB (5-20%) y durante el transcurso del tiempo de cultivo (24, 48 y 72 h), registrándose un aumento significativo y exponencial a las 72 h como observa en la Figura 41.

Estos resultados experimentales demuestran que el cultivo de osteoblastos utilizado en este trabajo expresan la actividad enzimática, marcadora clásica de los osteoblastos, como es la FA la cual aumento en más de 2,9 veces y de manera exponencial a las 72 h y es dependiente de la concentración del SFB, lo que coincide con el proceso de deposición de HP, lo cual fue demostrado cualitativamente en la Figura 32.

Los resultados encontrados en este trabajo sustentan los hallazgos publicados que demuestran que el SFB al 10% es necesario para las células se diferencien a osteoblastos y sean capaces de una actividad aumentada de FA. (212,229)

Adicionalmente, la actividad de FA fue evaluada bajo otras condiciones experimentales como fueron exponer los osteoblastos en cultivo a las citoquinas pro-inflamatorias como son la IL-6 y el TNF. La IL-6 a una concentración de 100 ng/ml produjo una reducción significativa en la actividad de la FA en los osteoblastos en cultivo a las 72 h como se muestra en la Figura 42. Los efectos y la transducción de señales de IL-6 en la diferenciación de osteoblastos de calvaria de rata han sido estudiados. La IL-6 y su receptor soluble redujeron significativamente la actividad de la FA, en forma dosis dependiente, lo que indica la existencia de efectos negativos de la IL-6 sobre la diferenciación de osteoblastos e inhibitorios de la osteoblastogénesis que han sido reportados (218-220).

Resultados similares fueron obtenidos cuando se utilizó, al TNF- α en los cultivos de osteoblastos a diferentes tiempos de cultivo como se puede observar en la Figura 43. El TNF- α a una concentración de 100 ng/ml produjo una reducción significativa en la actividad de la FA en los osteoblastos en cultivo a las 48 y 72 h.

Estos resultados demuestran que el TNF produce una inhibición significativa de la actividad de FA en los osteoblastos en cultivo, lo que ha sido reportado por Yoshihara y col (230).

También, se realizó los ensayos empleando el LPS y el CNP para evaluar sus efectos sobre la actividad de FA de los osteoblastos en cultivo, lo cual es fundamental para consolidar los hallazgos experimentales de este trabajo.

El LPS a una concentración de 100 ng/ml en los osteoblastos en cultivo a las 48 y 72 h, produjo una reducción significativa de la actividad de la FA como se muestra en la Figura 44. Estas observaciones coinciden con los hallazgos reportados sobre el efecto inhibitorio del LPS sobre la diferenciación de células osteoblásticas. (158, 226, 227). Hausman y col (226) utilizando osteoblastos de rata reportan que el LPS inhibió significativamente la actividad de la FA en un 60%, en forma dosis dependiente (0 a 100 ng de LPS) pero que no afectó la viabilidad y la proliferación de dichos osteoblastos. Esto último está en contradicción con nuestros hallazgos descritos en este trabajo.

Otra línea de evidencias sobre el efecto del LPS, provienen de los trabajos de Huang y col (231) quienes demostraron que el LPS fue capaz de suprimir la diferenciación osteogénica inducida por la BMP-2, (Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) que es un factor capaz de producir diferenciación de los osteoblastos e inducir la formación de hueso. Este efecto inhibitorio el LPS se expresó por el descenso de la expresión de la actividad de la FA y regulación negativa de los genes de la osteopontina y del colágeno tipo I, moléculas que están vinculadas a la osteogénesis.

De una manera opuesta, el CNP produjo una fuerte expresión de la actividad de la FA, que fue dependiente de la concentración de este péptido natriurético y del tiempo de cultivo. De manera interesante, el CNP a todas las concentraciones utilizadas indujo una expresión temprana, en relación a la actividad basal de la FA,

unas 12 veces a las 24 h. Esta inducción fue altamente significativa a una concentración de CNP (100nM), la cual produjo un incremento en la FA de 14 y 15 veces a las 48 y 72 h, respectivamente. (Ver Figura 46). Nuestros resultados coinciden con los trabajos reportados donde demuestran que el CNP es capaz de afectar la proliferación y diferenciación de células osteoblásticas de calvaria de rata, estimulando la actividad de la FA y la expresión del mRNA de la FA (72).

Estos resultados descritos en este trabajo demuestran que el CNP indujo la expresión de la FA de manera temprana (24 h) siendo más consistente a las 48 y las 72 h de cultivo. De manera opuesta, el LPS y las citoquinas pro-inflamatorias como son la IL-6 y el TNF- α fueron capaces de inhibir de manera significativa la actividad de la FA, lo cual sugiere que estas macromoléculas pueden afectar la producción de HP, como será descrito más adelante.

5.- La evaluación cuantitativa del proceso de osificación “in vitro” mediante la determinación de hidroxapatita utilizando técnicas espectrofotométricas en los osteoblastos en cultivo durante 24, 48 y 72 horas en respuesta al SFB, la IL-6, el TNF- α , el CNP y el LPS.

La mineralización es un proceso ubicuo en el reino animal y es fundamental para la formación del hueso. Los osteoblastos crean la nano-estructura del hueso secretando una matriz extracelular de colágeno (MEC) en la cuales los cristales de HP se forman posteriormente. Hasta la fecha se han identificado depósitos de fosfato de calcio en gránulos mitocondriales de los osteoblastos y vesículas intracelulares que transportan dicho material al medio extracelular como se ilustra en la Figura 63. (210).

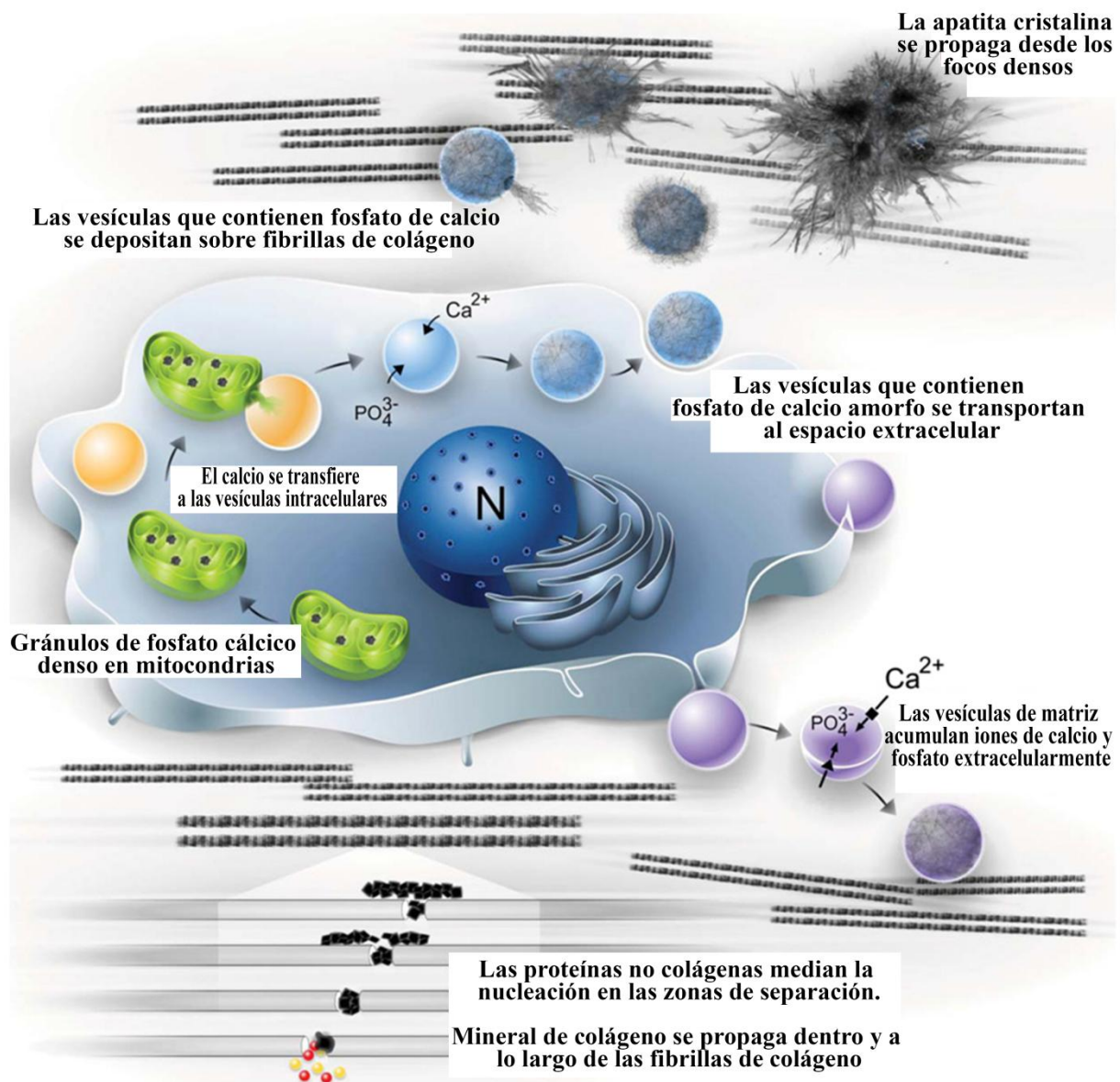


Figura 63. Modelo que ilustra la formación de HP en el osteoblasto. Tomado y modificado de la referencia 210.

La tinción del Rojo de Alizarina (RA), se utiliza para demostrar la capacidad de las células en cultivo de formar matriz ósea (HP) (190). Esta deposición de HP está relacionada al proceso de osificación “in vitro” que ocurre en los cultivos de osteoblastos maduros. Además, demuestra la presencia de calcio en el complejo de la HP $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ que se deposita en los pozos de cultivo (ver Figuras 30 y 32). La determinación de HP ha sido realizada de manera indirecta mediante la

determinación del calcio utilizando colorantes como el Arsenazo III (191). También se ha utilizado técnicas físicas no invasivas como la espectroscopia de Raman (232).

Actualmente no tenemos acceso a estas metodologías y decidimos emplear una aproximación cuantitativa utilizando técnicas espectrofotométricas y al rojo de Alizarina como un indicador del contenido de HP, por su capacidad de unirse al calcio presente en dicho complejo (192). Por lo antes mencionado, se procedió a desarrollar un método para extraer el complejo [RA-calcio] del material insoluble [RA-hidroxiapatita] adherido al fondo de los pozos y luego cuantificar de manera espectrofotométrica a 450 nm, el RA utilizando un lector de ELISA para placas de 96 pozos. Este método resultó ser muy práctico y fácil, de allí lo novedoso de la técnica aquí descrita. Así, la curva de calibración que relaciona la concentración de HP (50-1000 μg) y la absorbancia del RA a 450 nm fue lineal en el rango mencionado como se muestra en la Figura 47.

Al estandarizar esta metodología, se comenzó a evaluar el efecto de los diversos compuestos en estudio, sobre la formación de HP por los osteoblastos en cultivo. Así, se encontró que el SFB en cantidades crecientes (10 al 20%) fue capaz de inducir la deposición de HP a las 48 y 72 h. Además, esta deposición de HP fue significativa en especial a las 72 h de cultivo, como se puede observar en la Figura 48. Los resultados encontrados en este trabajo sustentan los hallazgos publicados donde demuestran que el SFB al 10% es necesario para que las células se diferencien a osteoblastos y sean capaces de formar matriz ósea (212,230).

El CNP en una forma concentración-dependiente fue capaz de inducir la deposición significativa de HP a 10 y 100 nM de CNP a las 72 h como se puede observar en la Figura 49. Estos hallazgos experimentales sustentan la hipótesis que el CNP es importante en la formación de hueso a nivel endocondreal (72,76,224). Recientemente, Kondo y col (225) han demostrado que ratones “mutados” que poseen una elevada concentración de CNP plasmático, son capaces de acelerar la resolución de fracturas óseas en comparación con el ratón normal. Además muestran que los receptores para el CNP (NPR.GC-B) se encuentran aumentados en el “callo” de la fractura. Estos resultados “in vivo” están en concordancia con nuestros hallazgos experimentales “in vitro” donde el CNP es capaz de aumentar, de manera

dosis dependiente, la formación de HP por los osteoblastos de rata. Toda esta información permite sustentar el hecho que el CNP participa en el remodelaje del hueso y acelera la formación del “callo” y la resolución de la fractura, como se discute en este trabajo.

Otras macromoléculas involucradas en la inflamación crónica como son la IL-6 y el TNF- α fueron evaluados sus efectos sobre la deposición de HP. En este sentido, la IL-6 fue capaz de inhibir de manera significativa, la deposición de HP en los osteoblastos cultivados por 72 h y en la presencia de 100 ng/ml de esta citoquina como se puede observar en la Figura 50. Los efectos y la transducción de señales de IL-6 en la diferenciación de osteoblastos de calvaria de rata han sido estudiados. La IL-6 y su receptor soluble redujeron significativamente la actividad de mineralización en forma dosis dependiente, lo que indica efectos negativos de la IL-6 en la diferenciación de osteoblastos (220). Estudios de transducción de señales demostraron que la IL-6 activa vías de señalización importantes para regular la diferenciación de los osteoblastos. Sin embargo, el papel de IL-6 en osteoblastogénesis sigue siendo polémico, con efectos estimuladores (233) e inhibitorios de la osteoblastogénesis que han sido descritos (218-220). El TNF- α fue capaz de inhibir de manera significativa la deposición de HP en los osteoblastos cultivados por 24, 48 y 72 h. a una baja concentración de 10 ng/ml. Este efecto inhibitorio fue más marcado en la presencia de 100 ng/ml de esta citoquina, y a cualquier tiempo de cultivo de los osteoblastos, sugiriendo casi una desaparición de la actividad de la formación de HP por parte del TNF- α , como se puede observar en la Figura 51. Es bien conocido que el TNF- α es capaz de disminuir la formación osteoblástica del hueso al suprimir la proliferación (221,234), la inducción de la apoptosis (222) y la inhibición de la diferenciación de los osteoblastos (177,178, 223).

Los resultados experimentales encontrados en este trabajo, demuestran que el TNF- α disminuye la producción de HP de los osteoblastos de rata “in vitro”, posiblemente al favorecer los mecanismos antes discutidos, lo cual puede explicar el poderoso efecto anti-osteoblastogénico del TNF- α descrito en este trabajo. Estos resultados experimentales sustentan el hecho que el TNF- α es considerado como

una de las citoquinas pro-inflamatorias con más poder osteolítico, por 2 mecanismos, a saber: Al inhibir la proliferación (234), maduración (221,223) y supervivencia de los osteoblastos (222) y por otra parte esta citoquina, es capaz de estimular la osteoclastogénesis (235,236). Ambos efectos sinérgicos conducen a la disminución del tejido óseo.

El LPS a 100 ng/ml fue capaz de inhibir de manera significativa la deposición de HP en los osteoblastos cultivados por 24, 48 y 72 h como se puede observar en la Figura 52. Estas observaciones coinciden con los hallazgos reportados sobre el efecto inhibitorio del LPS sobre la diferenciación de células osteoblásticas (158, 226, 227). Estos autores observaron que en osteoblastos de rata, el LPS inhibió significativamente la formación de nódulos en un 27% y la actividad de la FA en un 60%, en forma dosis dependiente (0 a 100 ng de LPS) (226). El LPS, parece ejercer su efecto anti-osteoblastico, vía la activación de las cascadas de las MAPK, al promover la fosforilación de las proteínas quinasas tipo JNK en células MC3T3-E1 (una línea de osteoblastos de calvaria del ratón C57/B6). Además, demuestran que el LPS suprime la expresión de genes específicos en osteoblastos como es la de FA. De manera que, el LPS puede inducir apoptosis de osteoblastos e inhibir la diferenciación de los mismos a través de la activación de la cascada de señalización vinculada a las proteínas quinasas tipo JNK (228).

Estos resultados sobre la formación y deposición de HP indican que en los osteoblastos en cultivo, el SFB a las concentraciones (10 y 20%) estimula de manera significativa la formación de HP en especial a las 72 h. De manera similar, el CNP en una forma concentración-dependiente fue capaz de inducir la deposición significativa de HP a 10 y 100 nM de CNP a las 72 h, sugiriendo que estas son las mejores condiciones donde el CNP (100nM) favorece la deposición “in vitro” de material óseo. Las vías de activación del CNP deben estar relacionadas a la estimulación de su receptor, la NPR-GC-B, (102,104) que puede ser evaluada mediante la determinación del GMPc, segundo mensajero (104) tópico que será discutido más adelante. De manera opuesta, las citoquinas como la IL-6 inhibió de manera significativa la deposición de HP en los osteoblastos cultivados por 72 h y en la presencia de 100 ng/ml de esta citoquina mediante la activación de cascadas de

señalización que inhiben, tanto la división osteoblástica como su maduración, ya que la formación de HP, fue disminuida por esta citoquina pro-inflamatoria. En el mismo sentido, el TNF- α fue capaz de inhibir de manera significativa la deposición de HP en los osteoblastos cultivados por 24, 48 y 72 h. a una baja concentración de 10 ng/ml. Este efecto inhibitorio fue más marcado en la presencia de 100 ng/ml de esta citoquina, y a cualquier tiempo de cultivo de los osteoblastos, sugiriendo casi una desaparición de la actividad de la formación de HP por esta citoquina. Teniendo en consideración, los resultados encontrados en este trabajo, es factible que el TNF- α disminuya la producción de HP, al favorecer la apoptosis celular, lo cual fue encontrado en los estudios de proliferación discutidos previamente. Sin embargo, no se pueden descartar otros mecanismos además de los mencionados. Finalmente, el LPS a 100 ng/ml fue capaz de inhibir de manera significativa, la deposición de HP en los osteoblastos cultivados por 24, 48 y 72 h. Nuestros resultados confirman lo ya es conocido que el LPS es el principal inhibidor de la diferenciación osteoblástica.

6.- La determinación de la actividad de la NPR-B (receptor del CNP) presente en los osteoblastos en cultivo, mediante la cuantificación del GMPc en distintas condiciones experimentales.

La realización de este Objetivo es un requisito fundamental para poder estudiar el efecto del CNP y sus interacciones con el LPS en los osteoblastos en cultivo. Este requisito consistió en demostrar en los osteoblastos en cultivo, la existencia de la actividad de la guanilciclase asociada a la membrana plasmática, y que es estimulada por el CNP y que ha sido denominada NPR-GC-B (70, 72, 74, 102, 104). La NPR-GC-B cataliza la transformación del GTP en el GMPc (102,104). Así, se procedió a estandarizar el método para la determinación del GMP cíclico, mediante un procedimiento, que tiene muchos años establecido, en la Sección de Biomembranas del IME, laboratorio donde se desarrollo la fase experimental de este trabajo y que es el radioinmunoensayo del GMPc (RIA). Dicho método fue desarrollado por la casa comercial Amersham/General Electric y cuyo basamento está descrito en la metodología. La curva de calibración para poder cuantificar los niveles de GMPc en los osteoblastos en cultivo se muestra en la Figura 53.

Los experimentos iniciales fueron diseñados para demostrar que los osteoblastos en cultivo expresan una actividad de la NPR-GC-B, la cual es estimulada por el CNP. Para obtener la mejor acumulación del GMPc se utilizó un inhibidor inespecífico de todas la fosfodiesterasas de los nucleótidos cíclicos (PDE) como ha sido descrito previamente (194). Este inhibidor es el isometilbutilxantina (IMBX), el cual fue añadido en un proceso de pre-incubación de 5 min, con la finalidad que penetrase al interior del osteoblasto e inhibiese dichas PDEs. Los resultados experimentales obtenidos en este trabajo, al evaluar los siguientes parámetros como son el fenotipo celular, la expresión de la FA y la deposición de HP nos indicaron 2 elementos importantes para la evaluar la actividad de la NPR-GC-B, los cuales fueron: 1.- El tiempo de cultivo de los osteoblastos de 48 y 72 h, que fueron los grupos celulares con características de osteoblastos maduros. 2.- Otro elemento definido fueron las concentraciones del CNP, a ser utilizada en estos ensayos, para determinar el GMPc. En tal sentido, se empleó el mismo rango de concentraciones del CNP para los experimentos donde se evaluaron los parámetros antes mencionados. Otro aspecto técnico que se utilizó para evaluar la producción del GMPc, fue expresarlo en función de número de células en cada pozo, ya que fue muy difícil realizar la extracción de las proteínas celulares, porque el método para la obtención del “extracto acido soluble” que utiliza ácido tricloroacético para precipitar las proteínas celulares de manera insoluble, hace difícil su extracción, solubilización y posterior cuantificación. Por lo anterior, se expresó la cantidad del GMPc por 1×10^4 células, las cuales fueron cuantificadas mediante el hemocitómetro.

El CNP fue capaz de estimular significativamente, de una manera dosis-dependiente, la producción de GMPc en los osteoblastos en cultivo a las 48 h y las 72 h como se puede observar en las Figuras 54 y 55 respectivamente. Adicionalmente, esta estimulación de la producción de GMPc por el CNP es potenciada por la pre-incubación con IMBX, como se puede observar en ambas Figuras, demostrando de manera indirecta la existencia de PDEs en estas células en cultivo. El efecto del CNP fue discretamente diferente en las células en cultivo a las 48 h y las 72h. La actividad de NPR-GC-B fue ligeramente mayor en las células a 72 h en comparación de los cultivos de 48 h.

Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con otros trabajos previamente publicados que postulan y aportan evidencias experimentales que el CNP activa a una NPR-GC-B, sistema enzimático que es responsable del incremento de los niveles intracelulares del GMPc, segundo mensajero vinculado al aumento de la diferenciación de los osteoblastos (69) y que además, promueve la síntesis de FA y la formación de nódulos mineralizados (HP) en la zona de osificación. El GMPc intracelular es sintetizado por dos clases de guanililciclasas: Las guanililciclasas solubles citoplásmicas que son activadas por el óxido nítrico (NO-GCs), y las guanilil ciclasas asociadas a membranas plasmáticas, cuya actividad es estimulada por los péptidos natriuréticos (NPR-GC), (70) siendo estas últimas las de nuestro interés en el presente trabajo.

Los NPR-GC son activadas por los péptidos natriuréticos (PN) como son el péptido natriurético atrial (ANP) y el péptido natriurético del cerebro (BNP) activan la NPR-A y el péptido natriurético tipo C (CNP) que activa la NPR-B produciendo respuestas de vasodilatación, natriuréticas, y diuréticas. Los PN son potentes reguladores del crecimiento celular (71-73).

Hagiwara y col (72) demostraron que el CNP promueve la formación de hueso a través del aumento en la producción de cGMP en osteoblastos de calvaria de rata. El CNP también estimuló la actividad de la FA y la mineralización de los nódulos por las células cultivadas, lo cual coincide con lo encontrado en la zona de osificación (69,130).

Todas las evidencias anteriores sustentan el hecho que el CNP actúa como un regulador positivo de la formación de hueso por los osteoblastos mediante la activación de la guanilil ciclasa (NPR-GC-B) asociada a membranas plasmáticas del osteoblasto (70). Esta NPR-GC-B es inducida por el 1,25-Dihidroxivitamina D3 en osteoblastos de ratón (237) y su expresión es disminuida por dexametasona en células osteoblásticas (238).

La activación de la NPR-GC-B ha sido vinculada a la cascada donde participa la PKGII, (131), la cual se postula que modula los factores de transcripción a nivel nuclear pero los componentes de dicha cascada son desconocidos hasta el momento.

7.-Estudio de las interacciones entre el CNP y el LPS sobre los diversos parámetros vinculados a la actividad osteoblástica como son la proliferación celular, la actividad de la fosfatasa alcalina, la actividad de la NPR-GC y el proceso de osificación “in vitro”.

Teniendo en consideración, los resultados experimentales obtenidos durante la realización de los Objetivos anteriores, encontramos que las células en cultivo a las 24 h no eran osteoblastos maduros y que el proceso de maduración comenzaba a las 48 h y que se completaba a las 72 h de cultivo. Así, se decidió que este objetivo que era estudiar las interacciones entre el CNP y el LPS sobre los diversos parámetros vinculados a la actividad osteoblástica como son la proliferación celular, la actividad de la FA, la actividad de la NPR-GC-B y el proceso de osificación “in vitro” (formación de HP) se realizaron con los osteoblastos de 48 y 72 h de cultivo. Otra observación experimental relevante fue que el método para evaluar la proliferación como es el MTS-PMS, el cual es poco sensible cuando ocurre una inhibición de dicha proliferación como describimos en la Figura 14, donde se encontró que el LPS inhibió la proliferación de los osteoblastos, efecto inhibitorio que fue solo significativo a 100 ng/ml a las 48 y 72 h de las células en cultivo. En función de lo anterior, decidimos utilizar el método de la determinación de proteínas como una medida de la proliferación de estas células bajo estudio. Usando esta aproximación experimental se procedió a estudiar el efecto del LPS en presencia de una concentración fija de CNP (100 nM), la cual habíamos determinado previamente que produjo la máxima proliferación de los osteoblastos (ver Figura 37). El LPS fue capaz de producir una fuerte inhibición de la estimulación de la proliferación inducida por el CNP (100 nM). Así, a una concentración de 10 ng/ml LPS fue capaz de inhibir la proliferación en los osteoblastos tanto a las 48 h y a las 72 h siendo mayor a las 72 h de cultivo. El LPS a una concentración de 100 ng/ml mostró una inhibición casi completa de la proliferación de los osteoblastos dependiente del CNP, independiente del tiempo de cultivo de los osteoblastos como se puede observar en la Figura 57 Es relevante mencionar que el efecto inhibitorio del LPS fue más pronunciado a las 72h. Así, utilizando los datos provenientes de los osteoblastos a 72 h de cultivo se estimó

la concentración inhibitoria 50% (CI_{50}) para el LPS, de $1,0 \pm 0,1$ ng/ml, como la concentración capaz de inhibir en un 50%, la proliferación dependiente del CNP de los osteoblastos en cultivo como se puede observar en la Figura 58. En estos experimentos, donde se evaluó el efecto de LPS, a una concentración fija de CNP, la activación del CNP fue variable por lo cual se considero que el 100% de la proliferación para cada grupo de experimentos fue la proliferación máxima inducida por el CNP (100 nM).

De igual manera, se procedió a evaluar el efecto del LPS sobre la activación de la actividad de FA inducida por el CNP (100 nM) y se encontró que el LPS fue capaz de producir una inhibición significativa de la actividad de FA a una concentración del 1 ng/ml de LPS y fue altamente significativa con concentraciones de LPS a 10 y 100 ng/ml. Este profundo efecto inhibitorio del LPS sobre la actividad de la FA, fue similar en los osteoblastos a las 48h y 72 h de cultivo como se puede observar en la Figura 59. De estos ensayos experimentales se estimó una CI_{50} : $1,0 \pm 0,1$ ng/ml para el LPS como la concentración que inhibió en un 50% la actividad de FA inducida por el CNP en los osteoblastos en cultivo, la cual fue independiente del tiempo de cultivo de los osteoblastos.

La deposición de HP dependiente del CNP (100 nM) fue afectada de manera significativa por el LPS como se muestra en la Figura 60. El LPS a una concentración de 10 ng/ml fue capaz de inhibir de manera significativa la deposición de HP. Este efecto inhibitorio fue más marcado a la concentración de 100 ng/ml. Es importante mencionar que el efecto inhibitorio del LPS no dependió del periodo del tiempo del cultivo de los osteoblastos. Estos datos experimentales permitieron estimar una CI_{50} : $1,0 \pm 0,1$ ng/ml para el LPS sobre la deposición de HP por los osteoblastos, que es independiente del periodo de cultivo.

Para tratar de entender estos efectos significativos del LPS sobre la estimulación de la proliferación inducida por el CNP, así como la inhibición de la actividad de FA y como consecuencia una reducción significativa en la deposición de hidroxiapatita se procedió a evaluar el efecto del LPS sobre la actividad de la NPR-GC-B, que es el receptor al CNP, presente en los osteoblastos como demostramos en las Figura 54 y 55. En estas condiciones experimentales se procedió a estudiar el

efecto del LPS sobre la activación por el CNP (100 nM) de la actividad de la NPR GC-B y se encontró que el LPS a bajas concentraciones como 1 y 10 ng/ml produjo una inhibición marcada, siendo esta inhibición casi total a los 100 ng/ml del LPS. Este efecto inhibitorio de la actividad de la NPR GC-B fue similar en los osteoblastos a las 48 h y a las 72 h de cultivo como se puede observar en la Figuras 54 y 55 respectivamente. En ambos grupos de ensayos se estimó una CI_{50} : $1,0 \pm 0,1$ ng/ml para el LPS, como la cantidad capaz de inhibir un 50% de la actividad de la NPR-GC-B estimulada por el CNP y presente en los osteoblastos en cultivo, la cual resulto ser idéntica en ambos grupos de experimentos.

Es relevante mencionar que en presencia del LPS, todas las actividades biológicas estimuladas por el CNP mostraron una CI_{50} similar de $1,0 \pm 0,1$ ng/ml, lo cual sugiere que el mecanismo de acción del LPS pudiese ser el mismo.

El LPS actúa a través de su receptor el TLR4, (ver Figura 64) que permite explicar el efecto inhibitorio del LPS sobre la proliferación de los osteoblastos, la expresión de la actividad de FA y la disminución de la formación de HP (227).

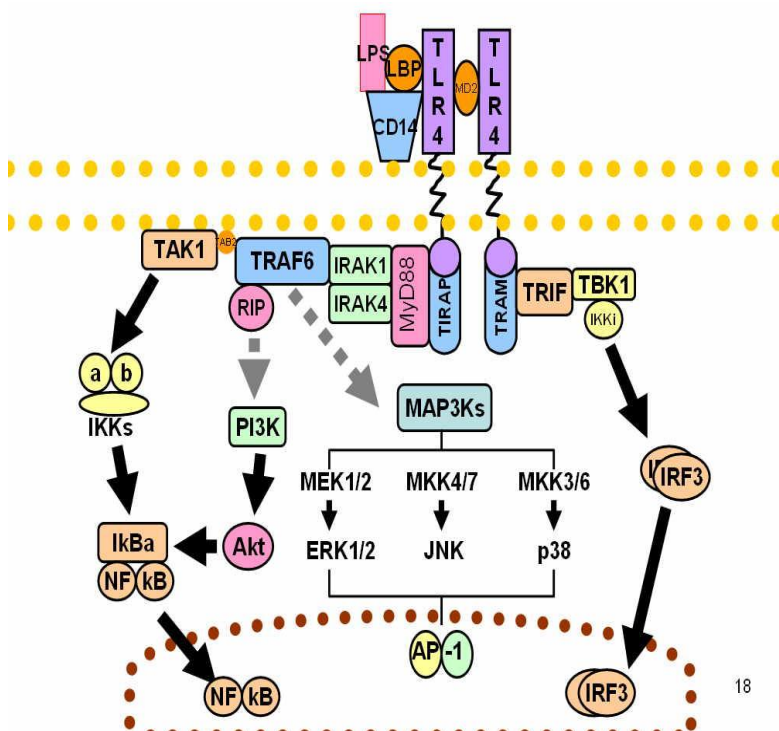


Figura 64. Modelo de la señalización del LPS. Vía de activación de las MAPK a través de la activación del TLR-4 mediante el LPS. (139).

Todas estas vías de señalización son relevantes para explicar el efecto inhibitorio del LPS sobre las actividades biológicas estimuladas por el CNP como son: la proliferación osteoblástica, la actividad FA y la formación de HP ya que estos efectos ocurren, a las 48 y las 72 h de cultivo y de exposición continua al LPS. Algunas de estas vías han sido identificadas en los osteoblastos (228)

Sin embargo, considero necesario señalar las condiciones experimentales novedosas descritas en este trabajo, donde los cultivos de osteoblastos de rata fueron expuestos de manera simultánea a un agente osteogénico (CNP) a una concentración máxima (100 nM) y a concentraciones crecientes del LPS (0, 10-100 ng/ml) que es una sustancia anti-osteogénica. Lo anterior significa que estas células fueron expuestas de manera continua a ambos compuestos durante 48 y 72 h de manera que, la proliferación estimulada por el CNP en osteoblastos maduros a las 72 h fue inhibida por el LPS con una IC_{50} de $1,0 \pm$ ng/ml. Así mismo, la estimulación de la actividad de FA dependiente del CNP fue inhibida con una IC_{50} de $1,0 \pm$ ng/ml de LPS y finalmente, la deposición de HP dependiente del CNP fue inhibida fuertemente con una IC_{50} de $1,0 \pm$ ng/ml de LPS. Así pues, todas las actividades osteogénicas dependiente del CNP fueron fuertemente inhibidas por el LPS y de manera similar estimándose una idéntica IC_{50} para todas ellas. Esto último sugiere que el efecto del LPS sobre las actividades osteogénicas inducidas por el CNP parecen estar mediadas a través de un mismo mecanismo molecular. Al respecto, el único mecanismo identificado con actividad biológica medible, para el CNP; es su respectivo receptor denominado NPR-GC-B, cuya actividad fue identificada en este trabajo, en los osteoblastos de calvaria de rata en cultivo.

En este sentido, para poder entender el efecto inhibitorio del LPS sobre la actividad de NPR-GC-B estamos proponiendo 2 hipótesis a saber:

1.- El LPS actúa inhibiendo la NPR-GC-B, de manera indirecta, vía la activación de su receptor TLR-4.

El receptor TLR-4 al igual que la NPR-GC-B están localizados en la superficie celular de los osteoblastos. El primero es estimulado por el LPS (159) para la producción y liberación de IL-1, IL-6, prostaglandina (PGE_2) y RANKL en

osteoblastos (155-158); mientras que el receptor para el CNP es la NPR-GC-B que al activarse produce un aumento de los niveles intracelulares de GMPc (69), activándose la PKG II (131) lo cual promueve un aumento en la expresión de la FA y la subsecuente formación de nódulos mineralizados y de hueso.

La actividad de la NPR-GC-B en los osteoblastos en cultivo fue determinada en un periodo de tiempo de 15 min, tiempo en que son expuestos al LPS y al CNP de manera simultánea. Bajo estas condiciones se observa un fuerte efecto inhibitorio del LPS sobre la actividad de la guanililciclase en estudio, lo cual no permite vislumbrar que las cascadas de señalización intracelulares acopladas al receptor TLR-4 (Ver Figura 64) pudiesen ejercer un efecto relevante sobre la actividad de la NPR-GC-B embebida en la membrana plasmática del osteoblasto. Sería posible que el parámetro tiempo no permite sustentar una “vía inhibitoria” de la NPR-GC-B mediante la activación del receptor TLR-4, cuya existencia ha sido demostrada en los osteoblastos (227).

2.- El LPS actúa inhibiendo directamente a la NPR-GC-B:

Los efectos rápidos (en el rango de 15 min.), donde existe el fuerte efecto inhibitorio ejercido por el LPS sobre la NPR-GC-B, en los osteoblastos se puede postular que el LPS actúa de manera directa sobre la NPR-GC-B como se puede observar en la Figura 65. Este es un modelo de NPR-GC-B que ha sido postulado previamente (104) y fue modificado para incluir al LPS como se muestra en la mencionada Figura. Así, el LPS, en especial el dominio del Lípido A, se puede incorporar de manera instantánea en la bicapa lipídica, sobre todo en la monocapa externa de la membrana plasmática del osteoblasto y puede afectar los segmentos transmembrana o yuxtamembrana de la nanomaquina que es la NPR-GC-B.

Para entender el efecto del LPS sobre la actividad de NPR-GC-B, es necesario proponer un mecanismo molecular, hasta ahora descrito para la NPR-GC-B, que está relacionado a la formación de un dímero, donde participa un dominio intracelular que se puede observar en la Figura 65. Este proceso de “dimerización” es esencial para la activación y ulterior producción del GMPc, en el sitio de esta enzima (108-110) que está en el interior del osteoblasto.

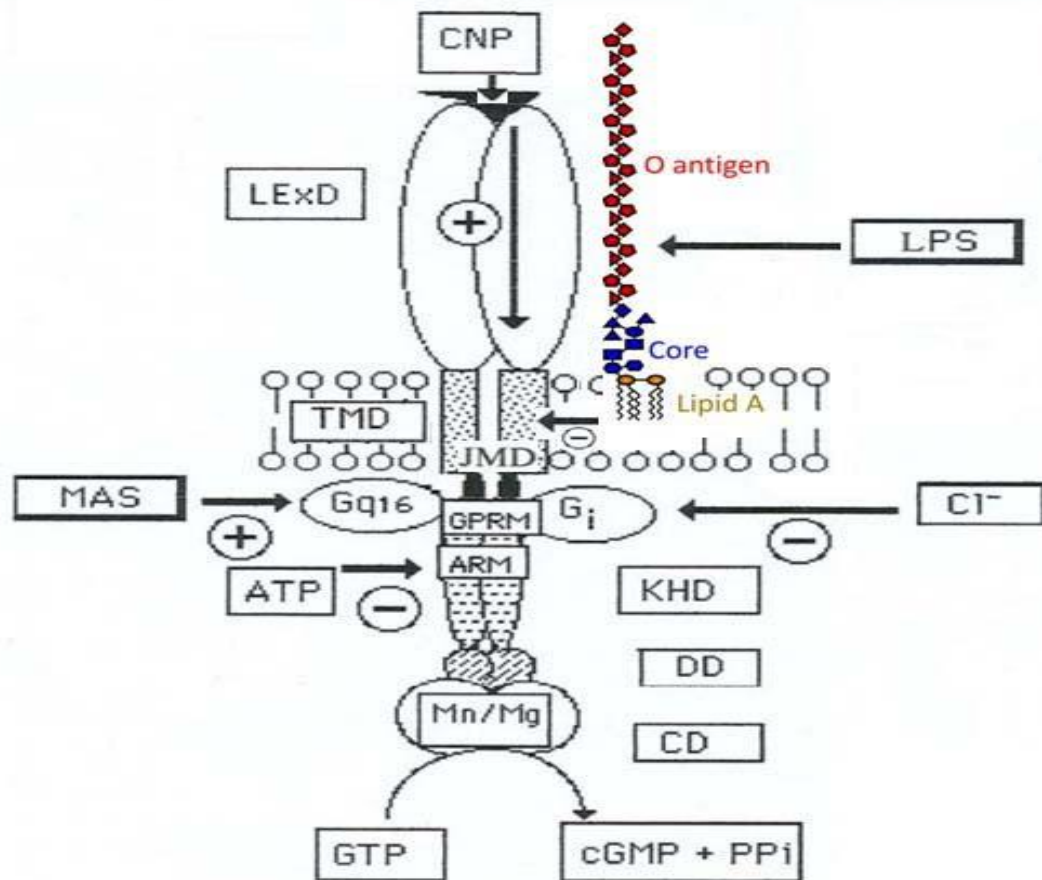
De una manera mecanística molecular, el sitio de unión al CNP está localizado en el los dominios extracelulares de la molécula de la NPR-GC-B; es a este nivel que la unión del CNP induce una cambio conformacional que se transmite a través de los segmentos transmembrana, hacia los sitios de dimerización y al catalítico localizados a nivel citoplasmático (ver Figura 65) del osteoblasto y de esta manera activar la producción del GMPc. En este sentido, el cambio conformacional inducido por el CNP puede ser bloqueado por el Lípido A, dominio del LPS, el cual por su naturaleza hidrofóbica se introduce en la bicapa lipídica y de esta manera puede interferir este cambio conformacional inducido por el CNP y producir un fuerte efecto inhibitorio del la NPRGC, como se demuestra en este trabajo.

El LPS, es una estructura compleja de lípidos y polisacáridos que se muestra en la Figura 66. La estructura central del Lipido A, ver Figura 67, en el caso del LPS utilizado en este trabajo que es proveniente de *E. coli* (239), es básicamente una estructura altamente glicosilada β -(1 $\rightarrow$ 6)- unidos un esqueleto de di-D-glucosamina bisfosforilado en la posición 1-O- y 4'-O- que posee un conjunto de residuos de 3-4 cadenas (C13) hidrocarbonadas (240), que se pueden intercalar en la monocapa externa de la bicapa lipídica. Además, posee 2 fosfatos que no le permiten su fácil penetración al interior celular y afectar directamente al sitio catalítico de la NPR-GC-B.

A manera de hipótesis, se puede proponer que el LPS a través del lípido A puede interferir en el mecanismo molecular del funcionamiento de la nanomaquina que es la NPR-GC B y de esta manera inactivar dicho sistema, que da inicio a las cascadas de señalización en el osteoblasto activadas por el CNP, las cuales van a conducir a un aumento de la expresión de la FA y la ulterior formación de nódulos mineralizados (HP) y hueso como demostramos en este trabajo de tesis Doctoral.

En resumen, el LPS no solamente afecta la proliferación de los osteoblastos, sino que también influye en la mineralización ósea y la formación del “callo” óseo a través de este novedoso mecanismo propuesto en este trabajo como es el bloqueo del efecto estimulador del CNP, sobre su receptor en el osteoblasto, que es la NPR-GC-B. Es importante enfatizar que el osteoblasto es la única célula diferenciada capaz de formar matriz ósea y por lo tanto hueso, material que es necesario para

lograr el remodelaje, acelerar la formación del “callo” óseo y la resolución de las fracturas. En este sentido, la presencia del LPS, como un producto de la actividad de bacterias gram-negativas en una osteomielitis o su presencia como contaminante en prótesis o implantes ortopédicos pudiese explicar lo difícil de la formación de “callo” óseo en las fracturas infectadas, así como la existencia de los aflojamientos asépticos de las prótesis y la ulterior pérdida funcional de dichos implantes.



LExD: Ligand Extracellular Domain
TMD: Transmembrane Domain
JMD: Juxtamembrane Domain
KHD: Kinase Homology Domain
DD: Dimerization Domain
CD: Catalytic Domain
GPRM: G-Protein-Regulatory Module
ARM: ATP-Regulatory Module

Figura 65. Modelo de la NPR-GC-B (Tomado de la Referencia 104).

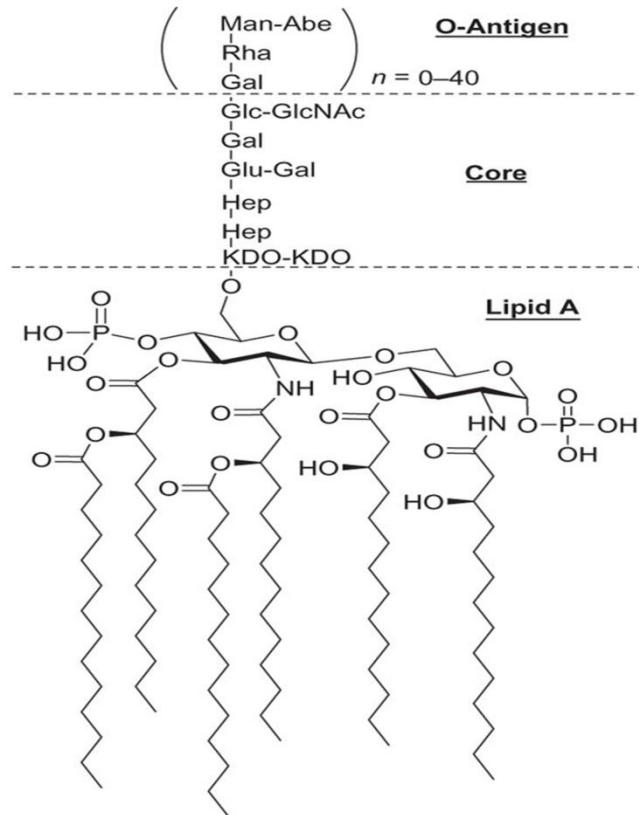


Figura 66. Estructura del LPS: Lipido A, núcleo de oligosacáridos y el antígeno "O".

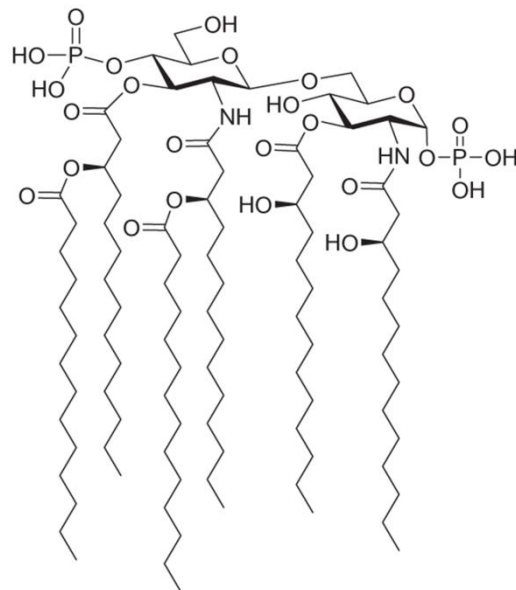


Figura 67. Estructura del Lipido A del LPS de E.coli.

CONCLUSIONES

En un modelo de cultivo de osteoblastos de rata, fueron evaluados mediante los siguientes parámetros:

- La proliferación celular.
- La actividad de fosfatasa alcalina (FA).
- La producción de hidroxiapatita (HP), determinada mediante método desarrollado en este trabajo,
- La caracterización fenotípica mediante coloraciones de H/E y con el Rojo de Alizarina para demostrar la presencia de gránulos de calcio.
- Además se utilizó una metodología de placas de 96 pozos donde fueron determinados los parámetros antes mencionados y así evitar más variaciones experimentales, al momento de comparar las respuestas celulares.

En estas condiciones experimentales establecimos que:

1. El SFB es un agente mitogénico para los osteoblastos y que estimula la producción de FA y de HP como referido en la literatura.
2. Las interleuquinas pro-inflamatorias como son la IL-6 y el TNF- α inhibieron la proliferación basal de los osteoblastos, así como también disminuyeron la actividad de la FA y la formación de HP tal como está descrito en la literatura.
3. El LPS inhibió la proliferación, la actividad de FA y la mineralización de los osteoblastos (formación de HP) de manera dosis dependiente. El LPS es un potente inductor de la apoptosis e inhibidor de la diferenciación de los osteoblastos a través de la activación de su receptor TLR-4.
4. El CNP estimuló la proliferación, la actividad de FA y la mineralización por parte de los osteoblastos (Formación de HP), de manera dosis dependiente. Ésto demuestra que el CNP participa en el remodelaje del hueso y acelera la formación del “callo” óseo y la resolución de las fracturas óseas, lo cual ha sido propuesto en estudios con animales intactos.
5. En nuestras condiciones experimentales y siendo ésto el Objetivo central de la presente Tesis Doctoral, encontramos que la exposición de los osteoblastos a la presencia simultánea del CNP y el LPS mostrara que las actividades

osteogénicas del CNP fueran fuertemente inhibidas, siendo las respectivas IC_{50} idénticas a las mostradas en la sola presencia del LPS.

6. El efecto inhibitorio del LPS sobre las actividades osteogénicas inducidas por el CNP puede estar mediado a través de los siguientes mecanismos moleculares: Una vía indirecta mediante la activación del receptor TLR-4 con sus cascadas de señalización intracelulares y una vía directa inhibiendo a la NPR-GC-B como se propone de manera novedosa en este trabajo.
7. Este último mecanismo de acción del LPS inhibiendo a la NPR-GC-B, permite abrir nuevas investigaciones en el área de la biología del hueso así como proponer nuevos procedimientos terapéuticos para evitar la acción anti-osteoblastogénica de este producto de la pared de las bacterias Gram-negativas.

REFERENCIAS

1. Ralston SH. Bone structure and metabolism. *Medicine*. 2013;41(10):581-5.
2. Heckman BR, Court-Brown JC, Tornetta P. Rockwood and Green's: Fracturas en el Adulto. Tomo 1. Principios Generales. (Quinta edición). Marban. 2007. Pág. 11 – 15.
3. Martini FH, Timmons MJ, Tallitsch RB. Human Anatomy. Pearson. (Seventh Edition). 2012.
4. Gilbert, SF. Osteogenesis: The Development of Bones. *Developmental Biology*. (Sixth edition). Sunderland. 2000.
5. Knothe Tate ML, Adamson JR, Tami AE, Bauer TW. The osteocyte. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2004;36(1):1-8.
6. Schaffler MB, Kennedy OD. Osteocyte signaling in bone. *Current osteoporosis reports*. 2012;10(2):118-25.
7. Everts V, Delaisse JM, Korper W, Jansen DC, Tigchelaar-Gutter W, Saftig P, et al. The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J Bone Miner Res*. 2002;17(1):77-90.
8. Vi L, Baht GS, Whetstone H, Ng A, Wei Q, Poon R, et al. Macrophages promote osteoblastic differentiation in-vivo: implications in fracture repair and bone homeostasis. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2015;30(6):1090-102.
9. Michael HR, Wojciech P. Tejido cartilaginoso. *Histología*. Ed. Médica Panamericana. (Quinta edición). 2006. pp. 198–208.
10. Finn G. Tejido esquelético. *Histología*. Ed. Médica Panamericana. (Tercera edición). 2000. p. 266.
11. Aubin JE, Liu F, Malaval L, Gupta AK. Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone*. 1995;17(2 Suppl):77s-83s.
12. Silva BC, Bilezikian JP. Parathyroid hormone: anabolic and catabolic actions on the skeleton. *Current opinion in pharmacology*. 2015;22:41-50.

13. Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*. 2003;423(6937):349-55.
14. Beresford JN, Graves SE, Smoothy CA. Formation of mineralized nodules by bone derived cells in vitro: a model of bone formation? *American journal of medical genetics*. 1993;45(2):163-78.
15. Liu F, Malaval L, Gupta AK, Aubin JE. Simultaneous detection of multiple bone-related mRNAs and protein expression during osteoblast differentiation: polymerase chain reaction and immunocytochemical studies at the single cell level. *Developmental biology*. 1994;166(1):220-34.
16. Stein GS, Lian JB, Owen TA. Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1990;4(13):3111-23.
17. Rodan GA, Martin TJ. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption - a hypothesis. *Calcified tissue international*. 1982;34(3):311.
18. Hanley DA, Watson PH, Hodsman AB, Dempster DW. Chapter 78 - Pharmacological Mechanisms of Therapeutics: Parathyroid Hormone A2 - Bilezikian, John P. In: Raisz LG, Martin TJ, editors. *Principles of Bone Biology* (Third Edition). San Diego: Academic Press; 2008. p. 1659-95.
19. Egbuna OI, Brown EM. Hypercalcaemic and hypocalcaemic conditions due to calcium-sensing receptor mutations. *Best practice & research Clinical rheumatology*. 2008;22(1):129-48.
20. Esbrit P, Alcaraz MJ. Current perspectives on parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein (PTHrP) as bone anabolic therapies. *Biochemical pharmacology*. 2013;85(10):1417-23.
21. Silva BC, Costa AG, Cusano NE, Kousteni S, Bilezikian JP. Catabolic and anabolic actions of parathyroid hormone on the skeleton. *J Endocrinol Invest*. 2011;34(10):801-10.
22. Dobnig H, Turner RT. The effects of programmed administration of human parathyroid hormone fragment (1-34) on bone histomorphometry and serum chemistry in rats. *Endocrinology*. 1997;138(11):4607-12.

23. Abou-Samra AB, Juppner H, Force T, Freeman MW, Kong XF, Schipani E, et al. Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: a single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol trisphosphates and increases intracellular free calcium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(7):2732-6.
24. Datta NS, Abou-Samra AB. PTH and PTHrP signaling in osteoblasts. *Cellular signalling*. 2009;21(8):1245-54.
25. Huang JC, Sakata T, Pflieger LL, Bencsik M, Halloran BP, Bikle DD, et al. PTH differentially regulates expression of RANKL and OPG. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2004;19(2):235-44.
26. Li JY, Walker LD, Tyagi AM, Adams J, Weitzmann MN, Pacifici R. The sclerostin-independent bone anabolic activity of intermittent PTH treatment is mediated by T-cell-produced Wnt10b. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2014;29(1):43-54.
27. Miller WL, Eberhardt NL. Structure and evolution of the growth hormone gene family. *Endocrine reviews*. 1983;4(2):97-130.
28. Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberators PA, Rosenblum CI, et al. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science (New York, NY)*. 1996;273(5277):974-7.
29. Silva CM, Day RN, Weber MJ, Thorner MO. Human growth hormone (GH) receptor is characterized as the 134-kilodalton tyrosine-phosphorylated protein activated by GH treatment in IM-9 cells. *Endocrinology*. 1993;133(5):2307-12.
30. Delesque-Touchard N, Park SH, Waxman DJ. Synergistic action of hepatocyte nuclear factors 3 and 6 on CYP2C12 gene expression and suppression by growth hormone-activated STAT5b. Proposed model for female specific expression of CYP2C12 in adult rat liver. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(44):34173-82.

31. Lahuna O, Rastegar M, Maiter D, Thissen JP, Lemaigre FP, Rousseau GG. Involvement of STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) and HNF-4 (hepatocyte nuclear factor 4) in the transcriptional control of the hnf6 gene by growth hormone. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md). 2000;14(2):285-94.
32. Liang L, Jiang J, Frank SJ. Insulin receptor substrate-1-mediated enhancement of growth hormone-induced mitogen-activated protein kinase activation. *Endocrinology*. 2000;141(9):3328-36.
33. Campbell GS, Pang L, Miyasaka T, Saltiel AR, Carter-Su C. Stimulation by growth hormone of MAP kinase activity in 3T3-F442A fibroblasts. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(9):6074-80.
34. Isaksson OG, Lindahl A, Nilsson A, Isgaard J. Mechanism of the stimulatory effect of growth hormone on longitudinal bone growth. *Endocrine reviews*. 1987;8(4):426-38.
35. Russell SM, Spencer EM. Local injections of human or rat growth hormone or of purified human somatomedin-C stimulate unilateral tibial epiphyseal growth in hypophysectomized rats. *Endocrinology*. 1985;116(6):2563-7.
36. Brixen K, Nielsen HK, Mosekilde L, Flyvbjerg A. A short course of recombinant human growth hormone treatment stimulates osteoblasts and activates bone remodeling in normal human volunteers. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1990;5(6):609-18.
37. Marcus R, Butterfield G, Holloway L, Gilliland L, Baylink DJ, Hintz RL, et al. Effects of short term administration of recombinant human growth hormone to elderly people. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990;70(2):519-27.
38. DiGirolamo DJ, Mukherjee A, Fulzele K, Gan Y, Cao X, Frank SJ, et al. Mode of growth hormone action in osteoblasts. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(43):31666-74.
39. Lau AN, Adachi JD. Role of teriparatide in treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Ther Clin Risk Manag*. 2010;6:497-503.
40. Steinman MQ, Trainor BC. Rapid effects of steroid hormones on animal behavior. *Nature Education Knowledge*. 2010;(10):1.

41. Manolagas SC, O'Brien CA, Almeida M. The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2013;9(12):699-712.
42. Jin Z, Li X, Wan Y. Minireview: nuclear receptor regulation of osteoclast and bone remodeling. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2015;29(2):172-86.
43. Tenover JL. Testosterone replacement therapy in older adult men. *Int J Androl*. 1999;22(5):300-6.
44. Riggs BL, Khosla S, Melton LJ, 3rd. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocrine reviews*. 2002;23(3):279-302.
45. Vanderschueren D, Vandenput L, Boonen S, Lindberg MK, Bouillon R, Ohlsson C. Androgens and bone. *Endocrine reviews*. 2004;25(3):389-425.
46. Bellido T, Jilka RL, Boyce BF, Girasole G, Broxmeyer H, Dalrymple SA, et al. Regulation of interleukin-6, osteoclastogenesis, and bone mass by androgens. The role of the androgen receptor. *The Journal of clinical investigation*. 1995;95(6):2886-95.
47. Falahati-Nini A, Riggs BL, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Eastell R, Khosla S. Relative contributions of testosterone and estrogen in regulating bone resorption and formation in normal elderly men. *The Journal of clinical investigation*. 2000;106(12):1553-60.
48. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine reviews*. 2000;21(2):115
49. Chen JR, Kousteni S, Bellido T, Han L, DiGregorio GB, Jilka RL, Manolagas SC. Gender-independent induction of murine osteoclast apoptosis in vitro by either estrogens or non-aromatizable androgens. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2001;16(Suppl 1):S159.
50. Kasperk CH, Wergedal JE, Farley JR, Linkhart TA, Turner RT, Baylink DJ. Androgens directly stimulate proliferation of bone cells in vitro. *Endocrinology*. 1989;124(3):1576-8.

51. Wakley GK, Schutte HD, Jr., Hannon KS, Turner RT. Androgen treatment prevents loss of cancellous bone in the orchidectomized rat. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1991;6(4):325-30.
52. Turner RT, Colvard DS, Spelsberg TC. Estrogen inhibition of periosteal bone formation in rat long bones: down-regulation of gene expression for bone matrix proteins. *Endocrinology*. 1990;127(3):1346-51.
53. Khosla S, Oursler MJ, Monroe DG. Estrogen and the skeleton. *Trends Endocrinol Metab*. 2012;23(11):576-81.
54. Hughes DE, Dai A, Tiffée JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat Med*. 1996;2(10):1132-6.
55. Chow J, Tobias JH, Colston KW, Chambers TJ. Estrogen maintains trabecular bone volume in rats not only by suppression of bone resorption but also by stimulation of bone formation. *The Journal of clinical investigation*. 1992;89(1):74-8.
56. Majeska RJ, Ryaby JT, Einhorn TA. Direct modulation of osteoblastic activity with estrogen. *J Bone Joint Surg Am*. 1994;76(5):713-21.
57. Qu Q, Perala-Heape M, Kapanen A, Dahllund J, Salo J, Vaananen HK, et al. Estrogen enhances differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture. *Bone*. 1998;22(3):201-9.
58. Gohel A, McCarthy MB, Gronowicz G. Estrogen prevents glucocorticoid-induced apoptosis in osteoblasts in vivo and in vitro. *Endocrinology*. 1999;140(11):5339-47.
59. Osuna C JA. Hormonas sexuales y hueso. *Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo*. 2003;1:9-16.
60. Munck A, Guyre PM, Holbrook NJ. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocrine reviews*. 1984;5(1):25-44.
61. Cruz-Topete D, Cidlowski JA. One hormone, two actions: anti- and pro-inflammatory effects of glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation*. 2015;22(1-2):20-32.

62. Woolf AD. An update on glucocorticoid-induced osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol*. 2007;19(4):370-5.
63. Canalis E. Mechanisms of glucocorticoid action in bone. *Current osteoporosis reports*. 2005;3(3):98-102.
64. Chen TL. Inhibition of growth and differentiation of osteoprogenitors in mouse bone marrow stromal cell cultures by increased donor age and glucocorticoid treatment. *Bone*. 2004;35(1):83-95.
65. Eijken M, Koedam M, van Driel M, Buurman CJ, Pols HA, van Leeuwen JP. The essential role of glucocorticoids for proper human osteoblast differentiation and matrix mineralization. *Mol Cell Endocrinol*. 2006;248(1-2):87-93.
66. Liu Y, Porta A, Peng X, Gengaro K, Cunningham EB, Li H, et al. Prevention of glucocorticoid-induced apoptosis in osteocytes and osteoblasts by calbindin-D28k. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2004;19(3):479-90.
67. Ma X, Zhang X, Jia Y, Zu S, Han S, Xiao D, et al. Dexamethasone induces osteogenesis via regulation of hedgehog signalling molecules in rat mesenchymal stem cells. *Int Orthop*. 2013;37(7):1399-404.
68. Cochard LR, Netter's Atlas of Human Embryology. The Musculoskeletal System. Elsevier Health Sciences. 2002; Plate# 198.
69. Inoue A, Hiruma Y, Hirose S, Yamaguchi A, Hagiwara H. Reciprocal regulation by cyclic nucleotides of the differentiation of rat osteoblast-like cells and mineralization of nodules. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;215(3):1104-10.
70. Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, et al. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev*. 2000;52(3):375-414.
71. Appel RG. Growth-regulatory properties of atrial natriuretic factor. *Am J Physiol*. 1992;262(6 Pt 2):F911-8.
72. Hagiwara H, Inoue A, Yamaguchi A, Yokose S, Furuya M, Tanaka S, et al. cGMP produced in response to ANP and CNP regulates proliferation and differentiation of osteoblastic cells. *Am J Physiol*. 1996;270(5 Pt 1):C1311-8.

73. Levin ER. Natriuretic peptide C-receptor: more than a clearance receptor. *Am J Physiol.* 1993;264(4 Pt 1):E483-9.
74. Koller KJ, Lowe DG, Bennett GL, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, et al. Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). *Science (New York, NY).* 1991;252(5002):120-3.
75. Hagiwara H, Sakaguchi H, Itakura M, Yoshimoto T, Furuya M, Tanaka S, et al. Autocrine regulation of rat chondrocyte proliferation by natriuretic peptide C and its receptor, natriuretic peptide receptor-B. *The Journal of biological chemistry.* 1994;269(14):10729-33.
76. Hagiwara H, Sakaguchi H, Lodhi KM, Suda K, Hirose S. Subtype switching of natriuretic peptide receptors in rat chondrocytes during in vitro culture. *J Biochem.* 1994;116(3):606-9.
77. Wu C, Wu F, Pan J, Morser J, Wu Q. Furin-mediated processing of Pro-C-type natriuretic peptide. *The Journal of biological chemistry.* 2003;278(28):25847-52.
78. Yeung VT, Ho SK, Nicholls MG, Cockram CS. Binding of CNP-22 and CNP-53 to cultured mouse astrocytes and effects on cyclic GMP. *Peptides.* 1996;17(1):101-6.
79. Tawaragi Y, Fuchimura K, Tanaka S, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. Gene and precursor structures of human C-type natriuretic peptide. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;175(2):645-51.
80. Totsune K, Takahashi K, Ohneda M, Itoi K, Murakami O, Mouri T. C-type natriuretic peptide in the human central nervous system: distribution and molecular form. *Peptides.* 1994;15(1):37-40.
81. Stingo AJ, Clavell AL, Heublein DM, Wei CM, Pittelkow MR, Burnett JC, Jr. Presence of C-type natriuretic peptide in cultured human endothelial cells and plasma. *Am J Physiol.* 1992;263(4 Pt 2):H1318-21.
82. Minamino N, Makino Y, Tateyama H, Kangawa K, Matsuo H. Characterization of immunoreactive human C-type natriuretic peptide in brain and heart. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;179(1):535-42.

83. Togashi K, Kameya T, Kurosawa T, Hasegawa N, Kawakami M. Concentrations and molecular forms of C-type natriuretic peptide in brain and cerebrospinal fluid. *Clin Chem*. 1992;38(10):2136-9.
84. Nakayama T. The genetic contribution of the natriuretic peptide system to cardiovascular diseases. *Endocr J*. 2005;52(1):11-21.
85. Ogawa Y, Itoh H, Yoshitake Y, Inoue M, Yoshimasa T, Serikawa T, et al. Molecular cloning and chromosomal assignment of the mouse C-type natriuretic peptide (CNP) gene (Nppc): comparison with the human CNP gene (NPPC). *Genomics*. 1994;24(2):383-7.
86. Chusho H, Tamura N, Ogawa Y, Yasoda A, Suda M, Miyazawa T, et al. Dwarfism and early death in mice lacking C-type natriuretic peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(7):4016-21.
87. Schulz S, Singh S, Bellet RA, Singh G, Tubb DJ, Chin H, et al. The primary structure of a plasma membrane guanylate cyclase demonstrates diversity within this new receptor family. *Cell*. 1989;58(6):1155-62.
88. Nagase M, Katafuchi T, Hirose S, Fujita T. Tissue distribution and localization of natriuretic peptide receptor subtypes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 1997;15(11):1235-43.
89. Chrisman TD, Schulz S, Potter LR, Garbers DL. Seminal plasma factors that cause large elevations in cellular cyclic GMP are C-type natriuretic peptides. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(5):3698-703.
90. Wilcox JN, Augustine A, Goeddel DV, Lowe DG. Differential regional expression of three natriuretic peptide receptor genes within primate tissues. *Mol Cell Biol*. 1991;11(7):3454-62.
91. Herman JP, Dolgas CM, Rucker D, Langub MC, Jr. Localization of natriuretic peptide-activated guanylate cyclase mRNAs in the rat brain. *J Comp Neurol*. 1996;369(2):165-87.
92. Langub MC, Jr., Dolgas CM, Watson RE, Jr., Herman JP. The C-type natriuretic peptide receptor is the predominant natriuretic peptide receptor mRNA expressed in rat hypothalamus. *J Neuroendocrinol*. 1995;7(4):305-9.

93. Abbey SE, Potter LR. Vasopressin-dependent inhibition of the C-type natriuretic peptide receptor, NPR-B/GC-B, requires elevated intracellular calcium concentrations. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(45):42423-30.
94. Abbey SE, Potter LR. Lysophosphatidic acid inhibits C-type natriuretic peptide activation of guanylyl cyclase-B. *Endocrinology*. 2003;144(1):240-6.
95. Chrisman TD, Garbers DL. Reciprocal antagonism coordinates C-type natriuretic peptide and mitogen-signaling pathways in fibroblasts. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(7):4293-9.
96. Langenickel T, Buttgereit J, Pagel I, Dietz R, Willenbrock R, Bader M. Forced homodimerization by site-directed mutagenesis alters guanylyl cyclase activity of natriuretic peptide receptor B. *Hypertension*. 2004;43(2):460-5.
97. Fenrick R, McNicoll N, De Lean A. Glycosylation is critical for natriuretic peptide receptor-B function. *Mol Cell Biochem*. 1996;165(2):103-9.
98. Fenrick R, Bouchard N, McNicoll N, De Lean A. Glycosylation of asparagine 24 of the natriuretic peptide receptor-B is crucial for the formation of a competent ligand binding domain. *Mol Cell Biochem*. 1997;173(1-2):25-32.
99. Potter LR, Hunter T. Identification and characterization of the major phosphorylation sites of the B-type natriuretic peptide receptor. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(25):15533-9.
100. Hirsch JR, Skutta N, Schlatter E. Signaling and distribution of NPR-Bi, the human splice form of the natriuretic peptide receptor type B. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;285(2):F370-4.
101. Tamura N, Garbers DL. Regulation of the guanylyl cyclase-B receptor by alternative splicing. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(49):48880-9.
102. Borges A, Villarroel SSd, Winand NJ, Bécemberg ILd, Alfonzo MJ, Alfonzo RGd. Molecular and Biochemical Characterization of a CNP-Sensitive Guanylyl Cyclase in Bovine Tracheal Smooth Muscle. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2001;25(1):98-103.

103. Suga S, Nakao K, Hosoda K, Mukoyama M, Ogawa Y, Shirakami G, et al. Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide. *Endocrinology*. 1992;130(1):229-39.
104. Alfonzo MJ, de Aguilar EP, de Murillo AG, de Villarroel SS, de Alfonzo RG, Borges A, et al. Characterization of a G protein-coupled guanylyl cyclase-B receptor from bovine tracheal smooth muscle. *J Recept Signal Transduct Res*. 2006;26(4):269-97.
105. Tamura N, Doolittle LK, Hammer RE, Shelton JM, Richardson JA, Garbers DL. Critical roles of the guanylyl cyclase B receptor in endochondral ossification and development of female reproductive organs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(49):17300-5.
106. Tsuji T, Kunieda T. A loss-of-function mutation in natriuretic peptide receptor 2 (Npr2) gene is responsible for disproportionate dwarfism in cn/cn mouse. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(14):14288-92.
107. Bartels CF, Bukulmez H, Padayatti P, Rhee DK, van Ravenswaaij-Arts C, Pauli RM, et al. Mutations in the transmembrane natriuretic peptide receptor NPR-B impair skeletal growth and cause acromesomelic dysplasia, type Maroteaux. *American journal of human genetics*. 2004;75(1):27-34.
108. Chinkers M, Wilson EM. Ligand-independent oligomerization of natriuretic peptide receptors. Identification of heteromeric receptors and a dominant negative mutant. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(26):18589-97.
109. Iwata T, Uchida-Mizuno K, Katafuchi T, Ito T, Hagiwara H, Hirose S. Bifunctional atrial natriuretic peptide receptor (type A) exists as a disulfide-linked tetramer in plasma membranes of bovine adrenal cortex. *J Biochem*. 1991;110(1):35-9.
110. Lowe DG. Human natriuretic peptide receptor-A guanylyl cyclase is self-associated prior to hormone binding. *Biochemistry*. 1992;31(43):10421-5.
111. Ogawa H, Qiu Y, Ogata CM, Misono KS. Crystal structure of hormone-bound atrial natriuretic peptide receptor extracellular domain: rotation mechanism for transmembrane signal transduction. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(27):28625-31.

112. Chinkers M, Garbers DL. The protein kinase domain of the ANP receptor is required for signaling. *Science* (New York, NY). 1989;245(4924):1392-4.
113. Koller KJ, de Sauvage FJ, Lowe DG, Goeddel DV. Conservation of the kinaselike regulatory domain is essential for activation of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclases. *Molecular and cellular biology*. 1992;12(6):2581-90.
114. Tucker CL, Hurley JH, Miller TR, Hurley JB. Two amino acid substitutions convert a guanylyl cyclase, RetGC-1, into an adenylyl cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(11):5993-7.
115. Sunahara RK, Beuve A, Tesmer JJ, Sprang SR, Garbers DL, Gilman AG. Exchange of substrate and inhibitor specificities between adenylyl and guanylyl cyclases. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(26):16332-8.
116. Jewett JR, Koller KJ, Goeddel DV, Lowe DG. Hormonal induction of low affinity receptor guanylyl cyclase. *Embo j*. 1993;12(2):769-77.
117. Koh GY, Nussenzveig DR, Okolicany J, Price DA, Maack T. Dynamics of atrial natriuretic factor-guanylate cyclase receptors and receptor-ligand complexes in cultured glomerular mesangial and renomedullary interstitial cells. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(17):11987-94.
118. Potter LR, Garbers DL. Dephosphorylation of the guanylyl cyclase-A receptor causes desensitization. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(21):14531-4.
119. Bryan PM, Potter LR. The atrial natriuretic peptide receptor (NPR-A/GC-A) is dephosphorylated by distinct microcystin-sensitive and magnesium-dependent protein phosphatases. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(18):16041-7.
120. Waldman SA, Rapoport RM, Murad F. Atrial natriuretic factor selectively activates particulate guanylate cyclase and elevates cyclic GMP in rat tissues. *The Journal of biological chemistry*. 1984;259(23):14332-4.
121. Chang CH, Kohse KP, Chang B, Hirata M, Jiang B, Douglas JE, et al. Characterization of ATP-stimulated guanylate cyclase activation in rat lung membranes. *Biochimica et biophysica acta*. 1990;1052(1):159-65.

122. Kurose H, Inagami T, Ui M. Participation of adenosine 5'-triphosphate in the activation of membrane-bound guanylate cyclase by the atrial natriuretic factor. *FEBS Lett.* 1987;219(2):375-9.
123. Song DL, Kohse KP, Murad F. Brain natriuretic factor. Augmentation of cellular cyclic GMP, activation of particulate guanylate cyclase and receptor binding. *FEBS Lett.* 1988;232(1):125-9.
124. Chinkers M, Singh S, Garbers DL. Adenine nucleotides are required for activation of rat atrial natriuretic peptide receptor/guanylyl cyclase expressed in a baculovirus system. *The Journal of biological chemistry.* 1991;266(7):4088-93.
125. Marala RB, Sitaramayya A, Sharma RK. Dual regulation of atrial natriuretic factor-dependent guanylate cyclase activity by ATP. *FEBS Lett.* 1991;281(1-2):73-6.
126. Wong SK, Ma CP, Foster DC, Chen AY, Garbers DL. The guanylyl cyclase-A receptor transduces an atrial natriuretic peptide/ATP activation signal in the absence of other proteins. *The Journal of biological chemistry.* 1995;270(51):30818-22.
127. Duda T, Goraczniak RM, Sitaramayya A, Sharma RK. Cloning and expression of an ATP-regulated human retina C-type natriuretic factor receptor guanylate cyclase. *Biochemistry.* 1993;32(6):1391-5.
128. Potter LR, Hunter T. Phosphorylation of the kinase homology domain is essential for activation of the A-type natriuretic peptide receptor. *Molecular and cellular biology.* 1998;18(4):2164-72.
129. Antos LK, Abbey-Hosch SE, Flora DR, Potter LR. ATP-independent activation of natriuretic peptide receptors. *The Journal of biological chemistry.* 2005;280(29):26928-32.
130. Miyazawa T, Ogawa Y, Chusho H, Yasoda A, Tamura N, Komatsu Y, et al. Cyclic GMP-dependent protein kinase II plays a critical role in C-type natriuretic peptide-mediated endochondral ossification. *Endocrinology.* 2002;143(9):3604-10.

131. Kaneki H, Kurokawa M, Ide H. The receptor attributable to C-type natriuretic peptide-induced differentiation of osteoblasts is switched from type B- to type C-natriuretic peptide receptor with aging. *J Cell Biochem.* 2008;103(3):753-64.
132. Malech HL, Gallin JI. Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases. *N Engl J Med.* 1987;317(11):687-94.
133. Kumar, Pathologic Basis of Disease. Chapter 26 - Bones, Joints, and Soft-Tissue Tumors. Professional Edition,(Eight edition). Saunders, An Imprint of Elsevier. 2009.
134. Kwan Tat S, Padrines M, Theoleyre S, Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine & growth factor reviews.* 2004;15(1):49-60.
135. Cho DR, Shanbhag AS, Hong CY, Baran GR, Goldring SR. The role of adsorbed endotoxin in particle-induced stimulation of cytokine release. *J Orthop Res.* 2002;20(4):704-13.
136. Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. *Sci Am.* 1992;267(2):54-61.
137. Darveau RP. Lipid A diversity and the innate host response to bacterial infection. *Current opinion in microbiology.* 1998;1(1):36-42.
138. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature.* 2000;406(6797):782-7.
139. Takeuchi O, Akira S. Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int Immunopharmacol.* 2001;1(4):625-35.
140. Janeway CA, Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1989;54 Pt 1:1-13.
141. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2001;1(2):135-45.
142. Gay NJ, Gangloff M. Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annu Rev Biochem.* 2007;76:141-65.

143. Hennessy EJ, Parker AE, O'Neill LA. Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(4):293-307.
144. Tidswell M, Tillis W, Larosa SP, Lynn M, Wittek AE, Kao R, et al. Phase 2 trial of eritoran tetrasodium (E5564), a toll-like receptor 4 antagonist, in patients with severe sepsis. *Crit Care Med.* 2010;38(1):72-83.
145. Bennett-Guerrero E, Grocott HP, Levy JH, Stierer KA, Hogue CW, Cheung AT, et al. A phase II, double-blind, placebo-controlled, ascending-dose study of Eritoran (E5564), a lipid A antagonist, in patients undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *Anesth Analg.* 2007;104(2):378-83.
146. Dubensky TW, Jr., Reed SG. Adjuvants for cancer vaccines. *Seminars in immunology.* 2010;22(3):155-61.
147. Cluff CW. Monophosphoryl lipid A (MPL) as an adjuvant for anti-cancer vaccines: clinical results. *Adv Exp Med Biol.* 2010;667:111-23.
148. Casella CR, Mitchell TC. Putting endotoxin to work for us: monophosphoryl lipid A as a safe and effective vaccine adjuvant. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(20):3231-40.
149. Mata-Haro V, Cekic C, Martin M, Chilton PM, Casella CR, Mitchell TC. The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4. *Science (New York, NY).* 2007;316(5831):1628-32.
150. Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H, Lee JO. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature.* 2009;458(7242):1191-5.
151. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med.* 1999;189(11):1777-82.
152. Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Iwakura Y, Akira S, et al. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol.* 2002;3(7):667-72.
153. Schromm AB, Lien E, Henneke P, Chow JC, Yoshimura A, Heine H, et al. Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin-induced signaling. *J Exp Med.* 2001;194(1):79-88.

154. Kang JY, Lee JO. Structural biology of the Toll-like receptor family. *Annu Rev Biochem.* 2011;80:917-41.
155. Keeting PE, Rifas L, Harris SA, Colvard DS, Spelsberg TC, Peck WA, et al. Evidence for interleukin-1 beta production by cultured normal human osteoblast-like cells. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 1991;6(8):827-33.
156. Sakuma Y, Tanaka K, Suda M, Komatsu Y, Yasoda A, Miura M, et al. Impaired bone resorption by lipopolysaccharide in vivo in mice deficient in the prostaglandin E receptor EP4 subtype. *Infect Immun.* 2000;68(12):6819-25.
157. Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, et al. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950).* 1990;145(10):3297-303.
158. Bandow K, Maeda A, Kakimoto K, Kusuyama J, Shamoto M, Ohnishi T, et al. Molecular mechanisms of the inhibitory effect of lipopolysaccharide (LPS) on osteoblast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;402(4):755-61.
159. Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *The Journal of biological chemistry.* 1999;274(16):10689-92.
160. Ohta S, Bahrin U, Shimazu R, Matsushita H, Fukudome K, Kimoto M. Induction of long-term lipopolysaccharide tolerance by an agonistic monoclonal antibody to the toll-like receptor 4/MD-2 complex. *Clin Vaccine Immunol.* 2006;13(10):1131-6.
161. Su GL, Klein RD, Aminlari A, Zhang HY, Steintraesser L, Alarcon WH, et al. Kupffer cell activation by lipopolysaccharide in rats: role for lipopolysaccharide binding protein and toll-like receptor 4. *Hepatology.* 2000;31(4):932-6.
162. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1998;95(2):588-93.

163. Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, et al. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature*. 2001;413(6851):78-83.
164. Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, et al. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2002;169(12):6668-72.
165. Oshiumi H, Matsumoto M, Funami K, Akazawa T, Seya T. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol*. 2003;4(2):161-7.
166. Zhang FX, Kirschning CJ, Mancinelli R, Xu XP, Jin Y, Faure E, et al. Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor-kappaB through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(12):7611-4.
167. Yang H, Young DW, Gusovsky F, Chow JC. Cellular events mediated by lipopolysaccharide-stimulated toll-like receptor 4. MD-2 is required for activation of mitogen-activated protein kinases and Elk-1. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(27):20861-6.
168. Matsuguchi T, Takagi K, Musikachoen T, Yoshikai Y. Gene expressions of lipopolysaccharide receptors, toll-like receptors 2 and 4, are differently regulated in mouse T lymphocytes. *Blood*. 2000;95(4):1378-85.
169. Cario E, Rosenberg IM, Brandwein SL, Beck PL, Reinecker HC, Podolsky DK. Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2000;164(2):966-72.
170. Kakimoto K, Musikachoen T, Chiba N, Bandow K, Ohnishi T, Matsuguchi T. Cot/Tpl2 regulates IL-23 p19 expression in LPS-stimulated macrophages through ERK activation. *Journal of physiology and biochemistry*. 2010;66(1):47-53.
171. Dumitru CD, Ceci JD, Tsatsanis C, Kontoyiannis D, Stamatakis K, Lin JH, et al. TNF-alpha induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell*. 2000;103(7):1071-83.

172. Kikuchi T, Yoshikai Y, Miyoshi J, Katsuki M, Musikacharoen T, Mitani A, et al. Cot/Tpl2 is essential for RANKL induction by lipid A in osteoblasts. *Journal of dental research*. 2003;82(7):546-50.
173. Ohnishi T, Okamoto A, Kakimoto K, Bandow K, Chiba N, Matsuguchi T. Involvement of Cot/Tp12 in bone loss during periodontitis. *Journal of dental research*. 2010;89(2):192-7.
174. Yogesha SD, Khapli SM, Srivastava RK, Mangashetti LS, Pote ST, Mishra GC, et al. IL-3 inhibits TNF-alpha-induced bone resorption and prevents inflammatory arthritis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2009;182(1):361-70.
175. Kirkwood KL, Li F, Rogers JE, Otremba J, Coatney DD, Kreider JM, et al. A p38alpha selective mitogen-activated protein kinase inhibitor prevents periodontal bone loss. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;320(1):56-63.
176. Kikuchi T, Matsuguchi T, Tsuboi N, Mitani A, Tanaka S, Matsuoka M, et al. Gene expression of osteoclast differentiation factor is induced by lipopolysaccharide in mouse osteoblasts via Toll-like receptors. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2001;166(5):3574-9.
177. Kadono H, Kido J, Kataoka M, Yamauchi N, Nagata T. Inhibition of osteoblastic cell differentiation by lipopolysaccharide extract from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*. 1999;67(6):2841-6.
178. Tomomatsu N, Aoki K, Alles N, Soysa NS, Hussain A, Nakachi H, et al. LPS-induced inhibition of osteogenesis is TNF-alpha dependent in a murine tooth extraction model. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2009;24(10):1770-81.
179. Orriss IR, Taylor SE, Arnett TR. Rat osteoblast cultures. *Methods Mol Biol*. 2012;816:31-41.
180. Phillips HJ, Terryberry JE. Counting actively metabolizing tissue cultured cells. *Exp Cell Res*. 1957;13(2):341-7.
181. Ricardo R, Phelan K. Counting and determining the viability of cultured cells. *J Vis Exp*. 2008(16).

182. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
183. Tada H, Shiho O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *Journal of immunological methods*. 1986;93(2):157-65.
184. Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd MR. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res*. 1991;51(10):2515-20.
185. Granjeiro JM, Taga EM, Aoyama H. Purification and characterization of a low-molecular-weight bovine kidney acid phosphatase. *An Acad Bras Cienc*. 1997;69(4):451-60.
186. de Souza Malaspina TS, dos Santos CX, Campanelli AP, Laurindo FR, Sogayar MC, Granjeiro JM. Tartrate-resistant acid phosphatase activity and glutathione levels are modulated during hFOB 1.19 osteoblastic differentiation. *J Mol Histol*. 2008;39(6):627-34.
187. Douglas AS, Donald MW, James HF. *Analytical Chemistry: Ultraviolet-Visible (UV-Vis) Spectroscopy –Derivation of Lambert-Beer law. An Introduction (Saunders Golden Sunburst Series) (Seventh edition)*. 1999.
188. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*. 1951;193(1):265-75.
189. Bensadoun A, Weinstein D. Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal Biochem*. 1976;70(1):241-50.
190. Cao JJ, Singleton PA, Majumdar S, Boudignon B, Burghardt A, Kurimoto P, et al. Hyaluronan increases RANKL expression in bone marrow stromal cells through CD44. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2005;20(1):30-40.

191. Janssen JW, Helbing AR. Arsenazo III: an improvement of the routine calcium determination in serum. *European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry : journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies*. 1991;29(3):197-201.
192. Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem*. 2004;329(1):77-84.
193. Kiernan JA *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*.(Fourth Edition). Bloxham, UK: Scion. 2008.
194. Placeres-Uray F, Gonzalez de Alfonso R, Lippo de Becemberg I, Alfonso MJ. Soluble guanylyl cyclase is reduced in airway smooth muscle cells from a murine model of allergic asthma. *World Allergy Organ J*. 2010;3(12):271-6.
195. Willert HG, Semlitsch M. Reactions of the articular capsule to wear products of artificial joint prostheses. *J Biomed Mater Res*. 1977;11(2):157-64.
196. Yasoda A, Ogawa Y, Suda M, Tamura N, Mori K, Sakuma Y, et al. Natriuretic peptide regulation of endochondral ossification. Evidence for possible roles of the C-type natriuretic peptide/guanylyl cyclase-B pathway. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(19):11695-700.
197. Dillon JP, Waring-Green VJ, Taylor AM, Wilson PJM, Birch M, Gartland A, et al. Primary Human Osteoblast Cultures. In: Helfrich MH, Ralston SH, editors. *Bone Research Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2012. p. 3-18.
198. Martin DR, Cox NR, Hathcock TL, Niemeyer GP, Baker HJ. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. *Experimental hematology*. 2002;30(8):879-86.
199. Liao HT, Chen CT, Chen JP. Osteogenic differentiation and ectopic bone formation of canine bone marrow-derived mesenchymal stem cells in injectable thermo-responsive polymer hydrogel. *Tissue Eng Part C Methods*. 2011;17(11):1139-49.
200. Bakker AD, Klein-Nulend J. Osteoblast isolation from murine calvaria and long bones. *Methods Mol Biol*. 2012;816:19-29.

201. Peck WA, Birge SJ, Jr., Fedak SA. Bone cells: biochemical and biological studies after enzymatic isolation. *Science (New York, NY)*. 1964;146(3650):1476-7.
202. Wong G, Cohn DV. Separation of parathyroid hormone and calcitonin-sensitive cells from non-responsive bone cells. *Nature*. 1974;252(5485):713-5.
203. Brauer A, Pohlemann T, Metzger W. Osteogenic differentiation of immature osteoblasts: Interplay of cell culture media and supplements. *Biotech Histochem*. 2016;91(3):161-9.
204. Hoemann CD, El-Gabalawy H, McKee MD. In vitro osteogenesis assays: influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathol Biol (Paris)*. 2009;57(4):318-23.
205. Owen M. Histogenesis of bone cells. *Calcif Tissue Res*. 1978;25(3):205-7.
206. Miller SC, Jee WS. The bone lining cell: a distinct phenotype? *Calcified tissue international*. 1987;41(1):1-5.
207. Holtrop ME. Light and electron microscopical structure of bone forming cells. In: Hall BK, editor, ed. *Bone*. Vol. 1: The Osteoblast and Osteocyte. Caldwell, NJ: The Telford Press;1990. 1–40.
208. Miani A, Malossini L, Miani C. [Alternate use of tetracycline and alizarin red S in the temporal study of osseous deposition]. *Boll Soc Ital Biol Sper*. 1964;40(20):1260-2.
209. Rahn BA, Perren SM. [Alizarin complexon-fluorochrome for bone and dentine labeling]. *Experientia*. 1972;28(2):180.
210. Boonrungsiman S, Gentleman E, Carzaniga R, Evans ND, McComb DW, Porter AE, et al. The role of intracellular calcium phosphate in osteoblast-mediated bone apatite formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(35):14170-5.
211. Martin JH, Matthews JL. Mitochondrial granules in chondrocytes, osteoblasts and osteocytes. An ultrastructural and microincineration study. *Clin Orthop Relat Res*. 1970;68:273-8.

212. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN, Antosz ME. Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. *Calcified tissue international*. 1986;38(3):143-54.
213. Yan L, Jiang DM. Study of bone-like hydroxyapatite/polyamino acid composite materials for their biological properties and effects on the reconstruction of long bone defects. *Drug Des Devel Ther*. 2015;9:6497-508.
214. Mitchison JM. Growth during the cell cycle. *Int Rev Cytol*. 2003;226:165-258.
215. van Rooijen N. Labelling of lymphocytes with various radiosotopes for in vivo tracer studies; a review. *Journal of immunological methods*. 1977;15(3):267-77.
216. Huang Q, Fu WL. Comparative analysis of the DNA staining efficiencies of different fluorescent dyes in preparative agarose gel electrophoresis. *Clin Chem Lab Med*. 2005;43(8):841-2.
217. Huyck L, Ampe C, Van Troys M. The XTT cell proliferation assay applied to cell layers embedded in three-dimensional matrix. *Assay Drug Dev Technol*. 2012;10(4):382-92.
218. Franchimont N, Wertz S, Malaise M. Interleukin-6: An osteotropic factor influencing bone formation? *Bone*. 2005;37(5):601-6.
219. Peruzzi B, Cappariello A, Del Fattore A, Rucci N, De Benedetti F, Teti A. c-Src and IL-6 inhibit osteoblast differentiation and integrate IGFBP5 signalling. *Nat Commun*. 2012;3:630.
220. Kaneshiro S, Ebina K, Shi K, Higuchi C, Hirao M, Okamoto M, et al. IL-6 negatively regulates osteoblast differentiation through the SHP2/MEK2 and SHP2/Akt2 pathways in vitro. *J Bone Miner Metab*. 2014;32(4):378-92.
221. Kotake S, Nanke Y. Effect of TNFalpha on osteoblastogenesis from mesenchymal stem cells. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1840(3):1209-13.
222. Pascher E, Perniok A, Becker A, Feldkamp J. Effect of 1alpha,25(OH)₂-vitamin D₃ on TNF alpha-mediated apoptosis of human primary osteoblast-like cells in vitro. *Horm Metab Res*. 1999;31(12):653-6.

223. Gilbert L, He X, Farmer P, Boden S, Kozlowski M, Rubin J, et al. Inhibition of osteoblast differentiation by tumor necrosis factor- α . *Endocrinology*. 2000;141(11):3956-64.
224. Kake T, Kitamura H, Adachi Y, Yoshioka T, Watanabe T, Matsushita H, et al. Chronically elevated plasma C-type natriuretic peptide level stimulates skeletal growth in transgenic mice. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2009;297(6):E1339-48.
225. Kondo E, Yasoda A, Fujii T, Nakao K, Yamashita Y, Ueda-Sakane Y, et al. Increased Bone Turnover and Possible Accelerated Fracture Healing in a Murine Model With an Increased Circulating C-Type Natriuretic Peptide. *Endocrinology*. 2015;156(7):2518-29.
226. Sveen K. Effects of a chemotactic factor and *Bacteroides fragilis* lipopolysaccharide on bone resorption in tissue culture. *Acta Pathol Microbiol Scand A*. 1980;88(4):263-8.
227. Liu YH, Huang D, Li ZJ, Li XH, Wang X, Yang HP, et al. Toll-like receptor-4-dependence of the lipopolysaccharide-mediated inhibition of osteoblast differentiation. *Genet Mol Res*. 2016;15(2).
228. Guo C, Yuan L, Wang JG, Wang F, Yang XK, Zhang FH, et al. Lipopolysaccharide (LPS) induces the apoptosis and inhibits osteoblast differentiation through JNK pathway in MC3T3-E1 cells. *Inflammation*. 2014;37(2):621-31.
229. Webster TJ, Siegel RW, Bizios R. Osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *Biomaterials*. 1999;20(13):1221-7.
230. Yoshihara R, Shiozawa S, Imai Y, Fujita T. Tumor necrosis factor α and interferon γ inhibit proliferation and alkaline phosphatase activity of human osteoblastic SaOS-2 cell line. *Lymphokine Res*. 1990;9(1):59-66.
231. Huang RL, Yuan Y, Zou GM, Liu G, Tu J, Li Q. LPS-stimulated inflammatory environment inhibits BMP-2-induced osteoblastic differentiation through crosstalk between TLR4/MyD88/NF- κ B and BMP/Smad signaling. *Stem cells and development*. 2014;23(3):277-89.

232. Tarnowski CP, Ignelzi MA, Jr., Morris MD. Mineralization of developing mouse calvaria as revealed by Raman microspectroscopy. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2002;17(6):1118-26.
233. Erices A, Conget P, Rojas C, Minguell JJ. Gp130 activation by soluble interleukin-6 receptor/interleukin-6 enhances osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res*. 2002;280(1):24-32.
234. Kawai VK, Stein CM, Perrien DS, Griffin MR. Effects of anti-tumor necrosis factor alpha agents on bone. *Curr Opin Rheumatol*. 2012;24(5):576-85.
235. Crockett JC, Rogers MJ, Coxon FP, Hocking LJ, Helfrich MH. Bone remodelling at a glance. *J Cell Sci*. 2011;124(Pt 7):991-8.
236. Redlich K, Smolen JS. Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11(3):234-50.
237. Yanaka N, Akatsuka H, Kawai E, Omori K. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 upregulates natriuretic peptide receptor-C expression in mouse osteoblasts. *Am J Physiol*. 1998;275(6 Pt 1):E965-73.
238. Suda M, Komatsu Y, Tanaka K, Yasoda A, Sakuma Y, Tamura N, et al. C-Type natriuretic peptide/guanylate cyclase B system in rat osteogenic ROB-C26 cells and its down-regulation by dexamethazone. *Calcified tissue international*. 1999;65(6):472-8.
239. Hase S, Rietschel ET. Isolation and analysis of the lipid A backbone. Lipid A structure of lipopolysaccharides from various bacterial groups. *European journal of biochemistry*. 1976;63(1):101-7.
240. White AF, Demchenko AV. Modulating LPS signal transduction at the LPS receptor complex with synthetic Lipid A analogues. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*. 2014;71:339-89.