

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la vida con orientación en
Biomedicina y Bionanotecnología**

**Establecimiento y caracterización de dos modelos para el
estudio de la remodelación ósea**

Tesis

Para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Brenda Ivette Iduarte Frias

Ensenada, Baja California, México
2018

Tesis defendida por
Brenda Ivette Iduarte Frias

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Patricia Juárez Camacho
Director de tesis

Miembros del comité
Dra. M. Del Pilar Sánchez Saavedra

Dr. Santiago Camacho López

Dra. Claudia Mariana Gómez Gutiérrez

Dra. Johanna Bernáldez Sarabia



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Brenda Ivette Iduarte Frias © 2018

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Brenda Ivette Iduarte Frias** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Innovación Biomédica.

Establecimiento y caracterización de dos modelos para el estudio de la remodelación ósea

Resumen aprobado por:

Dra. Patricia Juárez Camacho
Director de tesis

El sistema óseo cumple con una gran diversidad de funciones que contribuyen a la homeostasis del organismo, sin embargo, puede ser afectado por diversas patologías entre ellas la osteoporosis. La osteoporosis es una enfermedad que se caracteriza por una disminución de la densidad mineral ósea que compromete la fortaleza del hueso, aumenta el riesgo de fracturas, debilita físicamente y conduce a una disminución en la calidad de vida. Cada 3 segundos, ocurre una fractura osteoporótica en el mundo. Para comprender los mecanismos implicados en la remodelación ósea, mejorar las terapias actuales y estudiar nuevos agentes terapéuticos; es necesario desarrollar modelos que recreen el microambiente óseo. Por lo tanto, este trabajo tuvo como objetivo el establecimiento de diferentes modelos murinos para evaluar la remodelación ósea. Estos modelos incluyeron: 1. Un modelo *in vitro* de diferenciación a osteoclastos, o a osteoblastos empleando las líneas celulares RAW264.7 y MC3T3.E1 respectivamente. 2. Un modelo *ex vivo* para evaluar osteoclastogénesis a partir de médula ósea, y osteoblastogénesis partiendo de células aisladas de calvarias de ratón. 3. Un modelo murino para evaluar osteoporosis *in vivo*. La estandarización de los modelos *in vitro* mostró que las células RAW264.7 y MC3T3.E1 posiblemente perdieron su capacidad de diferenciación. Por otro lado, la utilización de médula ósea para osteoclastogénesis permitió obtener osteoclastos en 9 días utilizando medio complementado con factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y RANKL. De la misma forma, la complementación con ácido ascórbico y β -glicerofosfato al medio de cultivo de las células aisladas de calvarias de ratón durante 21 días, permitió la obtención de osteoblastos. Finalmente, los ratones hembra a los que se les realizó ovariectomía para la evaluación de la osteoporosis *in vivo*, presentaron señales de osteoporosis como son la atrofia del útero y la disminución de hueso trabecular. Nuestros resultados muestran que los modelos establecidos son reproducibles y que pueden utilizarse para el estudio de mecanismos óseos o la evaluación de compuestos que modulen la regeneración ósea.

Palabras clave: Osteoclastos, osteoblastos, remodelación ósea, osteoporosis, enfermedades óseas

Abstract of the thesis presented by **Brenda Ivette Iduarte Frias** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Science with orientation in Biomedical Innovation.

Establishment and characterization of two models for the study of bone remodeling

Abstract approved by:

Dra. Patricia Juárez Camacho
Thesis Director

The human skeletal system fulfills a great diversity of functions that contribute to the body homeostasis, however, like any other component of the human body, can be affected by diverse pathologies, including osteoporosis. Osteoporosis is a bone disease, characterized by a decreased bone mineral density, that compromises bone strength, increases the risk of fractures and physical debilitation leading to a drastic decrease in quality of life. Worldwide, one osteoporotic fracture occurs every 3 seconds. To understand the mechanisms involved in bone remodeling, to improve the osteoporosis current treatments and to search for new therapeutic agents, it is necessary to develop research models that recreate the bone microenvironment. Therefore, this work aimed to establish different murine models to evaluate the bone remodeling. These models included: 1. An *in vitro* model of osteoblast or osteoclast differentiation using RAW264.7/MC3T3.E1 cells; 2. An *ex vivo* model to evaluate osteoclast or osteoblast differentiation from bone marrow or cells isolated from murine calvaria, respectively; 3. A murine model to evaluate osteoporosis *in vivo*. Our results *in vitro* showed that under our conditions, RAW264.7 and MC3T3.E1 cells did not differentiate into bone cells. Besides, we successfully induced osteoclast differentiation from bone marrow cells incubated for 9 days in medium supplemented with macrophage colony stimulating factor (M-CSF) and RANKL. While cells isolated from mouse calvaria cultured with ascorbic acid and β -glycerophosphate during 21 days produced osteoblast differentiation. Finally, the female mice that were ovariectomized to evaluate the osteoporosis *in vivo*, showed osteoporosis signals such as uterus atrophy and trabecular bone reduction. Our results showed that the established models are reproducible and they can be used to the study of bone remodeling mechanisms or for evaluation of compounds that modulate bone regeneration.

Keywords: Osteoclasts, osteoblasts, bone remodeling, osteoporosis, bone diseases.

Dedicatoria

A todos ustedes que de alguna forma apoyaron y facilitaron la realización de este trabajo.

“I agree with those African tribes who decorate themselves with bones. It is more to my taste than diamonds, which are a cold and soulless shine. Whilst bone, ah bone, is the pit of a man after the cumbering flesh has been eaten away. Bone is power. It is bone to which the soft parts cling, from which they are, helpless, strung and held aloft to the sun, lest man be but another slithering earth-noser . . . What is this tissue that has double the strength of oak? One cubic inch of which will stand a crushing force of two tons? This substance that refuses to dissolve in our body fluids, but remains intact and solid through all vicissitudes of temperature and pollution? We may be grateful for this insolubility, for it is what stands us tall.”—Richard Selzer, *Mortal Lessons*, Harcourt-Brace, San Diego, 1974, pp. 51–52.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca No.613551 la cual me permitió concluir con éxito mis estudios de posgrado

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), por la oportunidad de incorporarme a su programa de posgrado, el apoyo y las facilidades prestadas

A la Dra. Patricia Juárez y al Dr. Pierrick Fournier, por recibirme en su grupo de trabajo. Especialmente a Paty por creer en mí, gracias por todo el apoyo brindado.

A mi comité de tesis, Dr. Santiago Camacho López, Dra. M. Del Pilar Sánchez Saavedra, Dra. Claudia Mariana. Gómez Gutiérrez y Dra. Johanna Bernáldez Sarabia, gracias por su tiempo y aportaciones.

Gracias a mis compañeros P&P: Arturo, Danna, Florian, Andrea, Rodrigo, Manuel, Alicia, por su apoyo en todo momento. Especialmente a Fernando que se tomó la molestia de explicarme y ayudarme hasta en lo más básico del laboratorio, y a Mitzu mejor compañera de trabajo no pude tener.

A mis compañeros y amigos: Daniel, Mitzu, Tere, Caro, Arturo, Enrique, voy a extrañar esas tardes de café, pláticas sobre la vida y desahogo.

A todos los que forman parte del Departamento de Innovación Biomédica.

A mi familia por siempre apoyarme a lo largo de mis estudios y siempre creer en mí.

A Rogelio, gracias por ayudarme a ser una mejor persona, a no tener miedo, por apoyarme, y sobre todo por siempre estar ahí, en las buenas y en las malas.

Tabla de contenido

	Páginas
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	xi
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	2
1.1.1 Fisiología ósea	2
1.1.2 Remodelación ósea: proceso y vías de señalización involucradas.....	4
1.1.3 Patologías óseas.....	7
1.1.4 Osteoporosis.....	7
1.1.4.1 Epidemiología.....	8
1.1.4.2 Fisiopatología de la osteoporosis.....	9
1.1.4.3 Tratamientos para la Osteoporosis.....	10
1.1.5 Modelos de estudio para regeneración ósea.....	12
1.1.5.1 Modelos <i>in vitro</i>	12
1.1.5.2 Modelos <i>in vivo</i>	13
1.2 Justificación.	14
1.3 Hipótesis.....	14
1.4 Objetivos.	14
1.4.1 Objetivo general.....	14
1.4.2. Objetivos específicos	15
Capítulo 2. Metodología	16
2.1 Modelos de osteoclastogénesis	16
2.1.1 Diferenciación de la línea celular RAW264.7 a osteoclastos	16
2.1.2 Extracción de medula ósea y diferenciación a osteoclastos.....	16
2.1.3 Caracterización de las células diferenciadas a osteoclastos.....	17
2.2. Modelos de osteoblastogénesis.....	18
2.2.1 Diferenciación de la línea celular MC3T3-E1 a osteoblastos	18

2.2.2. Aislamiento de células de calvarias de ratones neonatos y diferenciación a osteoblastos	18
2.2.3 Caracterización de las células diferenciadas a osteoblastos	19
2.3 Establecimiento del modelo murino de osteoporosis	19
2.3.1 Manejo y cuidado de ratones	19
2.3.2 Ovariectomía	20
2.3.3 Evaluación del modelo mediante histología	21
2.3.4 Evaluación del modelo por PCR cuantitativa en tiempo real	22
2.3.4.1 Extracción de RNA	22
2.3.4.2 Retrotranscripción del RNA	23
2.3.4.3 Evaluación de la expresión de genes mediante RT-qPCR	23
2.4 Análisis estadístico	24
Capítulo 3. Resultados	25
3.1 Establecimiento de modelos de osteoclastogénesis	25
3.1.1 Diferenciación de células RAW264.7 a osteoclastos	25
3.1.2 Diferenciación de células de medula ósea a osteoclastos	27
3.2 Establecimiento de modelos de osteoblastogénesis	28
3.2.1 Diferenciación de la línea celular MC3T3-E1 a osteoblastos	28
3.2.2 Cultivo y maduración de osteoblastos aislados de calvarias de ratones neonatos	30
3.3 Establecimiento de un modelo <i>in vivo</i> de osteoporosis	32
3.3.1 Evaluación de genes en hembras BALB/c de 8 semanas con ovariectomía	32
3.3.1.1 Extracción, cuantificación e integridad del RNA de húmeros de hembras BALB/c	32
3.3.1.2 Efecto de la ovariectomía en la expresión de genes asociados a remodelación ósea en hembras BALB/c	33
3.3.2 Evaluación de genes en hembras C57BL/6 de 8 semanas con ovariectomía	35
3.3.2.1 Extracción, cuantificación e integridad del RNA de húmeros provenientes de hembras C57BL/6 con OVX	35
3.3.2.2 Efecto de la ovariectomía en la expresión de genes asociados a remodelación ósea en hembras C57BL/6	37
3.3.3 Evaluación de genes en hembras C57BL/6 de 16 semanas con ovariectomía	38
3.3.3.1 Extracción, cuantificación e integridad del RNA de húmeros provenientes de hembras C57BL/6 de 16 semanas con OVX	38
3.3.3.2 Efecto de la ovariectomía en la expresión de genes asociados a remodelación ósea en hembras C57BL/6 de 16 semanas	39
3.3.4 Análisis histomorfométrico representativo de hueso	41

Capítulo 4. Discusión	43
4.1 Establecimiento de un modelo in vitro de osteoclastogénesis.....	43
4.2 Establecimiento de un modelo ex vivo de osteoclastogénesis.....	44
4.3 Establecimiento de un modelo in vitro de osteoblastogénesis.....	45
4.4 Establecimiento de un modelo ex vivo de osteoblastogénesis.....	46
4.5 Establecimiento de un modelo in vivo de osteoporosis mediante ovariectomía.....	46
Capítulo 5. Conclusiones	49
Literatura citada	50

Lista de figuras

Figura		Página
1	Estructura ósea.....	2
2	Células óseas y proceso de remodelación.....	4
3	Pérdida ósea derivada de osteoporosis	8
4	Terapias para la osteoporosis.....	11
5	Ilustración esquemática de ovariectomía con doble incisión dorsolateral.....	21
6	Tinción TRAP en RAW264.7 diferenciadas a osteoclastos.....	25
7	Imágenes representativas de la tinción TRAP en RAW264.7 cultivadas en presencia de RANKL.....	26
8	Tinción TRAP en células de médula ósea diferenciada a osteoclastos.....	27
9	Cuantificación de osteoclastos (OC) diferenciados a partir de células de médula ósea cultivadas en presencia de dos concentraciones distintas de RANKL.....	28
10	Tinción Fosfatasa Alcalina (AP) en células MC3T3.E1 diferenciadas a osteoblastos....	29
11	Tinción Alizarin Red en células MC3T3.E1 cultivadas en ausencia y presencia de ácido ascórbico y β -glicerofosfato.....	30
12	Tinción de Fosfatasa Alcalina en células aisladas de calvarias de ratón y cultivadas en presencia de ácido ascórbico y β -glicerofosfato.....	31
13	Tinción Alizarin Red células aisladas de calvarias de ratón y cultivadas en presencia de ácido ascórbico y β -glicerofosfato.....	31
14	Evaluación de la integridad del RNA total extraído de húmeros de hembras BALB/c de 8 semanas en gel de agarosa al 1%.....	33
15	Evaluación de RANKL y OPG en hembras BALB/c con ovariectomía.....	34
16	Efectos de ovariectomía sobre la expresión relativa de genes asociados a osteoclastos y osteoblastos en hembras BALB/c con ovariectomía.....	35
17	Evaluación de la integridad del RNA total extraído de húmeros de hembras C57BL/6 de 8 semanas con ovariectomía y grupo control en gel de agarosa.....	36
18	Evaluación de RANKL y OPG en hembras C57BL/6 de 8 semanas con ovariectomía....	37
19	Evaluación de la expresión relativa de genes asociados a osteoclastos y osteoblastos en hembras C57BL/6 de 8 semanas con OVX.....	38

20	Gel de agarosa que muestra el ARN total extraído de humeros de hembras C57BL/6 de 16 semanas utilizando Trizol y un kit comercial.....	39
21	Expresión relativa del mRNA de RANKL, OPG y proporción RANKL/OPG de húmeros provenientes de hembras C57BL/6 de 16 semanas con OVX.....	40
22	Evaluación de genes asociados a osteoclastos y osteoblastos en hembras C54BL/6 de 16 semanas con OVX.....	41
23	Histología representativa.....	42

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Secuencias de primers empleados en las reacciones de RT-qPCR.....	24
2	Cuantificación del RNA proveniente de húmeros de hembras BALB/C de 8 semanas de edad con ovariectomía y grupo control.....	32
3	Cuantificación del RNA proveniente de humeros de hembras C57BL/6 de 8 semanas con ovariectomía y grupo control.....	36
4	Cuantificación del RNA proveniente de húmeros de hembras C57BL/6 de 16 semanas de edad con ovariectomía y grupo control.....	39

Capítulo 1. Introducción

El tejido óseo es un sistema altamente dinámico, que mantiene su integridad mediante ciclos de resorción y formación denominados en conjunto remodelación ósea. Sin embargo, también es un tejido susceptible al desarrollo de patologías, derivadas de la pérdida en el equilibrio existente en las fases del remodelado. Entre los padecimientos que afectan al sistema óseo el de mayor frecuencia es la osteoporosis, un trastorno esquelético caracterizado por una densidad y calidad ósea disminuida. Los huesos de pacientes con osteoporosis son más porosos y frágiles, lo que resulta en un riesgo incrementado de sufrir fracturas. Afecta a más de 200 millones de personas en todo el mundo, principalmente adultos mayores, y su incidencia va incrementando junto con la esperanza de vida de las poblaciones (Klibanski et al., 2001; HHS, 2004).

Las células responsables de la resorción ósea son los osteoclastos, mientras que los osteoblastos son las células encargadas de secretar los componentes de la matriz ósea y mineralizarla. Mientras cumplen sus funciones los osteoblastos pueden quedar embebidos en la matriz ósea y entonces se diferencian terminalmente a osteocitos. En la osteoporosis la actividad de los osteoclastos en comparación con los osteoblastos esta incrementada, lo que induce una disminución en la calidad ósea.

Los tratamientos para la osteoporosis pueden dividirse en dos grupos, el primero conformado por compuestos anabólicos (en ellos la teriparatida un fármaco análogo de la hormona paratiroidea) que estimulan la formación de hueso, y el segundo grupo son los fármacos antirresortivos (por ejemplo bifosfonatos y el anticuerpo anti-RANKL) que inhiben la diferenciación de osteoclastos o que inducen su apoptosis. Sin embargo, estas terapias únicamente permiten detener el proceso de la enfermedad, y cuando se suspende su uso la densidad ósea regresa a la inicial.

Para comprender los mecanismos involucrados en la remodelación ósea, encontrar formas óptimas de administrar las terapias existentes o mejorarlas, y evaluar nuevos agentes terapéuticos, ha sido necesario el desarrollo de modelos. Actualmente existen modelos que permiten el estudio de osteoclastos y osteoblastos en condiciones *in vitro*, modelos *ex vivo* como el cultivo primario de células o de explantes de hueso. Además de modelos *in vivo* como los de osteoporosis mediante ovariectomía o inducción química en ratones. Por lo tanto este trabajo plantea el establecimiento de modelos de osteoclastogénesis y osteoblastogénesis, además de la implementación de un modelo *in vivo* de osteoporosis mediante ovariectomía, con el fin de estudiar la remodelación ósea así como evaluar compuestos con potencial terapéutico.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Fisiología ósea

El esqueleto humano está constituido por más de 200 huesos, que cumplen con una gran diversidad de funciones entre las que se encuentran el proveer un sitio de adherencia y soporte para los músculos, proteger órganos vitales, participar en las vías metabólicas asociadas con la homeostasis mineral y el equilibrio ácido-base, servir como un reservorio de factores de crecimiento y citocinas, y suministrar el medio para la hematopoyesis (Boskey y Robey, 2013).

En términos histológicos, podemos encontrar en el esqueleto dos tipos de tejido óseo (Figura 1): uno cortical (conocido como hueso compacto) y otro trabecular (también llamado hueso esponjoso). El hueso cortical constituye aproximadamente el 80% del volumen en el esqueleto adulto y forma una capa externa en todos los huesos confiriéndoles rigidez y elasticidad. El hueso trabecular representa cerca del 20% del esqueleto y forma espículas en zonas localizadas en el interior de los huesos donde alberga a la médula ósea (Lerner, 2012).

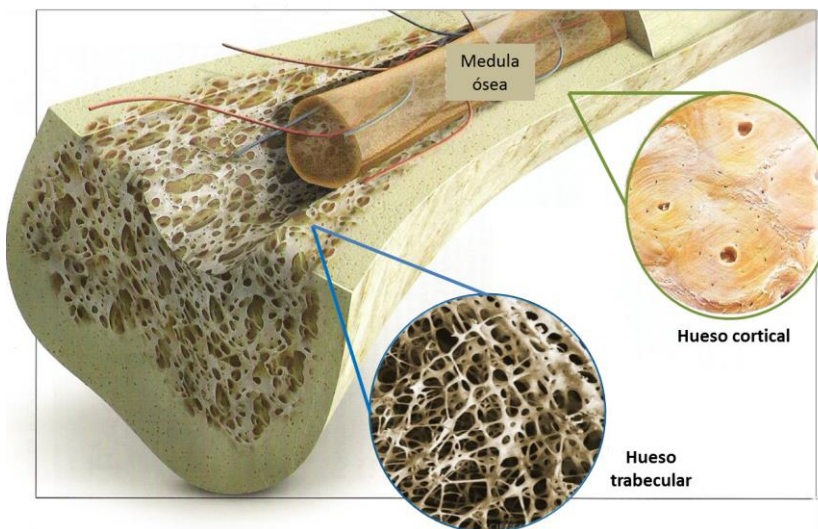


Figura 1. Estructura ósea. La estructura ósea se compone de dos tipos de tejidos: uno cortical (conocido como hueso compacto) el cual forma una capa externa, y el trabecular (también llamado hueso esponjoso), localizado en el interior de los huesos (Modificado de Lerner, 2012).

Los huesos están constituidos por una fase inorgánica, que principalmente es una forma impura de hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$. La fase orgánica se compone mayoritariamente de fibras de colágeno. Sin

embargo en la matriz ósea también se puede encontrar proteínas no colágenas (PNCs) entre ellas: proteoglicanos, principalmente condroitina sulfato y ácido hialurónico, osteocalcina, factores de crecimiento y citocinas, como el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), la osteoprotegerina (OPG), el factor de necrosis tumoral (TNF) y las proteínas morfogenética ósea (BMPs) (Clark, 2005; Morgan et al., 2008).

El hueso es un tejido altamente dinámico, que a lo largo de nuestra vida es sometido a un proceso denominado remodelación ósea, este sistema le permite mantener su integridad a través de la destrucción y formación equilibrada. Tres tipos de células se asocian a este proceso y como constituyentes del tejido óseo (Figura 2):

- 1) Los **osteoblastos**, son células de estirpe mesenquimal responsables de producir los componentes de la matriz ósea y de su posterior mineralización. Durante el proceso de secreción de matriz, algunos osteoblastos maduros quedan atrapados en la nueva matriz ósea y se diferencian a osteocitos, por el contrario los osteoblastos que permanecen en la superficie del hueso se les llama células de revestimiento plano. Los osteoblastos pueden regular la diferenciación de osteoclastos paracrinamente, al incrementar o disminuir la secreción de citocinas indispensables como lo son: el ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B (RANKL), el factor estimulante de colonias de macrófago (M-CSF) y osteoprotegerina. De forma independiente a su función ósea se cree que también pueden regular la función de distintos tejidos blandos (Lerner, 2012; Marie y Cohen-Solal, 2017).
- 2) Los **osteocitos**, son las células más abundantes de los tres tipos de células óseas, se encuentran dentro de lagunas en el interior del hueso recién formado. Poseen estructuras dendríticas que se extienden a través de estructuras denominadas canalículos, mediante las cuales forman una red de comunicación, que también permite el intercambio de nutrientes. Los osteocitos, tienen la capacidad de traducir señales mecánicas en bioquímicas. Recientemente se reconoció que estas células desempeñan un papel esencial en la regulación de la remodelación ósea, al secretar agentes que permiten modular la actividad de los osteoblastos y osteoclastos. Por ejemplo la secreción de esclerostina, puede inhibir la vía de señalización Wnt/ β -catenina. La activación de esta vía es necesaria para la diferenciación de preosteoblastos a osteoblastos (Stern et al., 2012; Marie y Cohen-Solal, 2017).

3) Los **osteoclastos** cumplen la función de resorción ósea, es decir, remueven la matriz mineralizada. Estas células poseen características morfológicas y fenotípicas que se emplean de forma rutinaria para identificarlas en el laboratorio. Por ejemplo, son células multinucleadas (de tres o más núcleos) que expresan la fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP). Para poder diferenciarse a partir de células hematopoyéticas de linaje monocito/macrófago requieren principalmente del estímulo de dos citocinas el M-CSF y de RANKL (Marino et al., 2014).

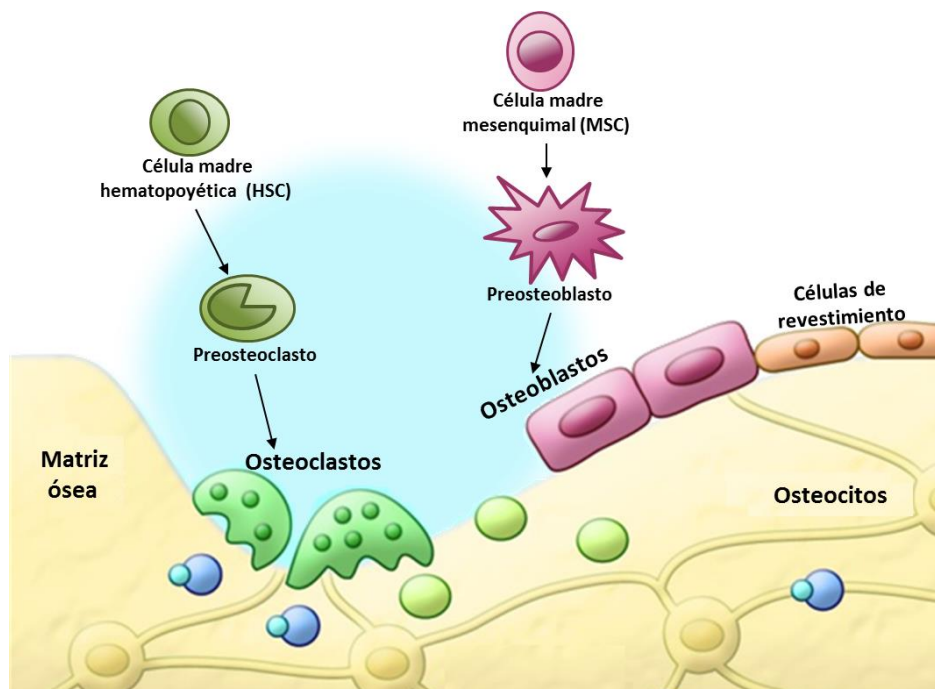


Figura 2. Células óseas y proceso de remodelación. El proceso de remodelación puede dividirse en cuatro etapas principales la fase de activación, formación y terminación, en cada etapa las células óseas (osteoclastos, osteoblastos y osteocitos) cumplen con funciones importantes (Modificado de Crane y Cao, 2014).

1.1.2 Remodelación ósea: proceso y vías de señalización involucradas

La remodelación ósea puede dividirse en cuatro etapas principales que implican el trabajo conjunto de osteoclastos, osteoblastos y osteocitos.

Fase de activación. La primera etapa de la remodelación implica ósea la detección de una señal iniciadora. La señal censada puede ser resultado de tensión mecánica directa sobre el hueso por fracturas, la privación de oxígeno generada al inmovilizar extremidades, por acción hormonal sobre las células óseas, o el uso prolongado de glucocorticoides. Independientemente del origen del estímulo, el resultado suele

ser la apoptosis de osteocitos y un aumento en la osteoclastogénesis (Raggatt y Partridge, 2010; Bonewald, 2013).

Fase de Resorción. En respuesta a las señales generadas por osteocitos o a las señales de activación hormonal, los osteoblastos secretan la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1) para reclutar a las células precursoras de osteoclastos a la zona de resorción, donde se fusionarán para formar osteoclastos (Hadjidakis y Androulakis, 2006). Los osteoclastos maduros secretan metaloproteinasas (MMP) de matriz, principalmente la MMP-9, para degradar la matriz mineralizada y exponer los sitios de adhesión a los que se unen mediante las integrinas $\alpha\beta3$, formando un microambiente aislado conocido como "zona de sellado". Dentro de esta zona se secretan protones, iones cloruro y distintas enzimas necesarias para degradar las porciones inorgánicas de la matriz ósea, produciendo las lagunas de resorción de Howship. La matriz ósea orgánica restante es degradada por enzimas colagenasas principalmente por catepsina K, los productos de la resorción son eliminados por endocitosis y transcitosis, y liberados desde la membrana basolateral hacia el fluido extracelular fuera del sitio de resorción (Raggatt y Partridge, 2010; Marino et al., 2014).

La vía de señalización OPG-RANK-RANKL es una de las principales rutas que controla la diferenciación y activación de los osteoclastos. El estímulo conjunto del M-CSF y de RANKL induce la diferenciación de los precursores de osteoclastos a osteoclastos. Mientras que RANKL también promueve la actividad de los osteoclastos. OPG es un receptor señuelo que compite contra RANK por su ligando, es decir RANKL, por tanto su principal función es inhibir la osteoclastogénesis. Cuando se lleva a cabo la unión de RANKL con su receptor RANK, la proteína adaptadora TRAF6 es reclutada, el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) es activado y translocado al núcleo. Donde aumenta la expresión de la proteína c-Fos, la cual interactúa con el factor nuclear de células-T activadas (NFATc1) para desencadenar la transcripción de genes osteoclastogénicos (Ross, 2013; Rivadeneira y Mäkitie, 2016).

Fase de formación. Una célula de linaje desconocido, es la encargada de eliminar el colágeno remanente en las lagunas de Howship y de preparar la superficie ósea para la posterior formación de hueso. Una vez que las células madre mesenquimales se encuentran en las zonas de resorción, se diferencian a osteoblastos tras el estímulo por las proteínas morfogénicas óseas (BMPs). Los osteoblastos entonces secretan los componentes que formarán el tejido óseo nuevo. El colágeno tipo I es el principal componente orgánico del hueso y para su mineralización la hidroxiapatita es incorporada por los osteoblastos (Raggatt y Partridge, 2010).

El proceso de mineralización no se conoce por completo, pero se ha sugerido que inicia con la formación de vesículas que contienen iones Ca^{2+} y fosfato inorgánico (Pi), en el interior de los osteoblastos. Para ello, enzimas como la fosfatasa alcalina inespecífica de tejido (AP) y la fosfodiesterasa de nucleótido pirofosfatasa incrementan la concentración de Pi circundante. Las moléculas de unión al calcio, tales como anexinas, fosfatidilserina y la sialoproteína ósea, atraen y controlan la acumulación de los iones dentro de las vesículas, antes de la formación de cristales de hidroxiapatita insolubles. El pH intravesicular se eleva, por acción de la anhidrasa carbónica para estabilizar los cristales de hidroxiapatita iniciales. Posteriormente las vesículas con cargo son perforadas para liberar los cristales de hidroxiapatita, distribuirlos y depositarlos sobre las fibras de colágeno (An et al., 2016).

La naturaleza de la señal que coordina la transición entre resorción y formación ósea sigue sin ser clara, aunque se han propuesto varios mecanismos, por ejemplo, el reclutamiento de células osteoprogenitoras mediante la secreción de esfingosina 1-fosfato por osteoclastos. Se ha demostrado que esta molécula promueve la supervivencia de osteoblastos maduros (Pederson et al., 2008). Por otro lado el señalizador ephrinB2 secretado por osteoclastos mejora la diferenciación a osteoblastos, suprime la diferenciación a osteoclastos, además se ha demostrado que su sobre expresión incrementa la masa ósea en ratones (Zhao et al., 2006).

Las principales vías de señalización que regulan a los osteoblastos y por ende la formación ósea, son en las que participan los reguladores transcripcionales Runx2 y Osterix. Runx2 es un regulador maestro de la osteoblastogénesis, modula la expresión de distintos genes incluyendo Colágeno tipo I (Col1a1), Fosfatasa alcalina (ALP), Osteopontina (OPN), Osteonectina (ON) y Osteocalcina (OC). Además, regula la expresión del factor de transcripción Osterix, el cual puede interactuar con el factor nuclear para células T activadas 2 (NFAT2), y controlar la transcripción de genes relacionados con la actividad de osteoblastos. Por otro lado el factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1) a través del receptor IGF1, activa la vía de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K)-Akt y Ras-ERK MAP, e induce la expresión de Osterix, promoviendo así la diferenciación osteoblástica (De Gorter y Ten Dijke, 2013). La vía de señalización Wnt tiene efectos en la proliferación, diferenciación y apoptosis de las células óseas, en osteoblastos se activa al disminuir los niveles de expresión de esclerostina por osteocitos. Las proteínas Wnts activan la vía al unirse a los receptores Frizzled y LRP5/6, esta unión induce la fosforilación de la β -catenina evitando que sea degradada. La β -catenina regula la transcripción de los genes diana que inducen la diferenciación de células mesenquimales a osteoblastos (Yao et al., 2017).

Fase de terminación. Posterior al proceso de mineralización, los osteoblastos maduros experimentan apoptosis, se diferencian terminalmente a osteocitos o a células de revestimiento óseo. Se ha sugerido que el restablecimiento de los niveles basales de esclerostina por parte de los osteocitos, puede ser una de las señales que indican a los distintos participantes de la remodelación que es tiempo de detenerse, sin embargo este mecanismo es en gran medida desconocido (Raggatt y Partridge, 2010).

Cuando la cantidad de hueso formado es igual a la proporción de hueso resorbido el ciclo de remodelación concluye, el reposo en la superficie ósea se restablece y se mantiene hasta que sea necesario iniciarlo nuevamente.

1.1.3 Patologías óseas

Los sistemas que mantienen en equilibrio la remodelación ósea pueden sufrir desbalances, generando patologías en las que hay señales de estimulación o inhibición de la resorción o de la formación ósea, comprometiendo las funciones óseas a nivel local o sistémico. Entre los principales padecimientos se encuentran la osteopetrosis, la osteonecrosis, la enfermedad de Paget, osteosarcoma y la osteoporosis, además de muchos otros trastornos que afectan indirectamente al interferir con el metabolismo mineral (HHS, 2004). En este trabajo se hará referencia específicamente a la osteoporosis.

1.1.4 Osteoporosis

La osteoporosis, es un trastorno caracterizado por una baja masa ósea y un deterioro en la microarquitectura del esqueleto que conducen a una disminución en la resistencia ósea e incrementa el riesgo de sufrir fracturas (Figura 3). La osteoporosis postmenopáusica es la forma más común de osteoporosis y la de mayor incidencia de las patologías que afectan el sistema esquelético (Weinstein y Manolagas, 2000). La resistencia ósea requiere de dos características: la densidad mineral ósea (BMD por sus siglas en inglés) y la calidad ósea. La BMD mide la cantidad en gramos de materia mineral por área determinada en cualquier individuo, el valor obtenido se compara con una BMD óptima (la medida estándar corresponde a la de un adulto de 30 años en buen estado de salud). La diferencia entre la BMD medida y la BMD óptima se expresa en desviaciones estándar (DE). Una DE igual a -1.0 o superior indica

una densidad ósea normal, mientras que -2.5 o más desviaciones estándar por debajo de 0 se encuentre, más baja es la densidad mineral ósea y mayor el riesgo de fractura. La calidad ósea se refiere a la arquitectura, el recambio óseo, la acumulación de daños (por ejemplo microfracturas) y la mineralización (Klibanski et al., 2001).

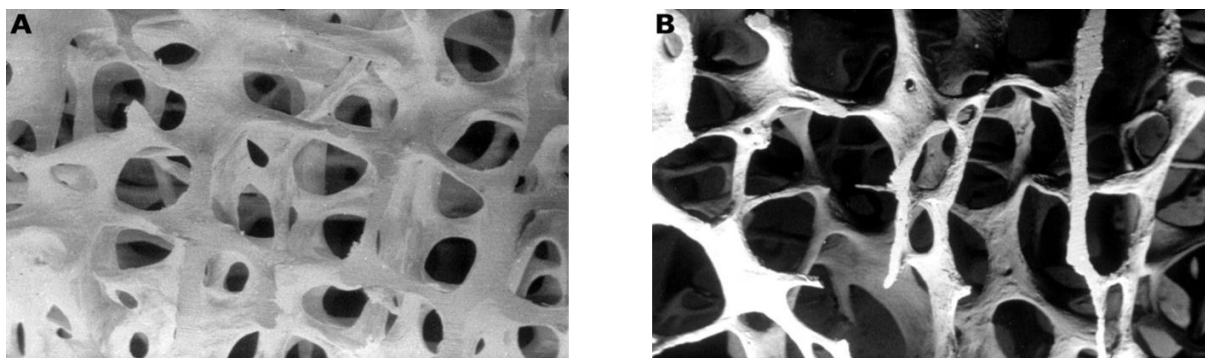


Figura 3. Pérdida ósea derivada de osteoporosis. (A) Micrografía electrónica de barrido de hueso trabecular donde se muestra la arquitectura ósea en salud y (B) en osteoporosis con incremento en la porosidad y en la distancia entre trabéculas (Al-Azzawi, F.2001.*Postgraduate medical journal*, 77(907), 292-304).

La osteoporosis puede clasificarse en “primaria”, la cual se presenta tanto en mujeres como en hombres sin importar la edad, a menudo se atribuye al envejecimiento. La osteoporosis “secundaria” es desarrollada a raíz de algún otro padecimiento, por ejemplo, la enfermedad celíaca con síndrome de malabsorción asociado, el hipogonadismo, y el uso de algunos fármacos como glucocorticoides (Kleerekoper, 2013).

1.1.4.1 Epidemiología

La osteoporosis es la patología ósea de mayor incidencia, se estima que más de 200 millones de personas la padecen alrededor del mundo. De acuerdo a datos de la Fundación Internacional de Osteoporosis (IOF por sus siglas en inglés), una de cada tres mujeres y uno de cada cinco hombres de más de 50 años de edad está en riesgo sufrir una fractura osteoporótica durante su vida, ocurriendo más de 8.9 millones de fracturas cada año. En México, 1 de cada 4 personas tiene osteopenia u osteoporosis y la probabilidad de tener una fractura de cadera a los 50 años es de 8,5% para las mujeres y de 4% para los hombres (Harvey et al., 2009; IOF, 2015).

El tratamiento de fracturas derivadas de la osteoporosis tiene un impacto económico de alrededor de \$ 17.9 billones de dólares por año en los Estados Unidos. En nuestro país en el año 2006, el costo estimado de la asistencia sanitaria únicamente para tratar fracturas de cadera derivadas de osteoporosis fue de \$ 97.0 millones (IOF, 2015).

La mortalidad asociada a osteoporosis es mayor inmediatamente después de la fractura y disminuye gradualmente con el tiempo. Aunque, la causa de la muerte no suele atribuirse directamente a la propia fractura, sino a otras enfermedades crónicas. En los Estados Unidos, el 7% de los sobrevivientes de todos los tipos de fractura tienen algún grado de incapacidad permanente, y el 8% requieren cuidados de enfermería por el resto de su vida (Harvey et al., 2009).

La esperanza de vida está aumentando en todo el mundo, y en consecuencia el número de personas de edad avanzada, estos cambios demográficos por sí solos pueden incrementar la incidencia de osteoporosis en el mundo (Sözen et al, 2017).

1.1.4.2 Fisiopatología de la osteoporosis

El establecimiento de la osteoporosis es inducido por múltiples factores en cada individuo, sin embargo se ha asociado con la deficiencia de estrógenos en mujeres postmenopáusicas, la falta de calcio y de vitamina D, el hiperparatiroidismo, la ingesta de glucocorticoides y polimorfismos en genes prioritarios para el desarrollo óseo. De forma independiente a los factores anteriores la pérdida ósea puede establecerse por alteraciones en el organismo derivadas del envejecimiento, por ejemplo, al envejecer disminuye la expresión de la hormona del crecimiento, lo que conduce a una reducción en la producción hepática del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 y 2 (IGF-1 e IGF-2). Estos factores inducen la diferenciación de osteoblastos, y por ende la formación de hueso se ve disminuida. También la diferenciación de las células mesenquimales se ve favorecida hacia tejido adiposo (Raisz, 2005; Drake y Khosla, 2013).

La deficiencia de estrógenos tiene un impacto marcado en el sistema óseo, debido a sus efectos sobre las células que lo componen. Promueven la diferenciación de las células pre-osteoblásticas a osteoblastos, puede modular la apoptosis de osteoblastos y osteocitos, inducir un incremento en la expresión de factores de crecimiento (como IGF-1 y TGF- β) y en la síntesis de pro-colágeno. También tiene

un efecto indirecto sobre los osteoclastos al inhibir la expresión de RANKL e incrementar la producción de OPG en los osteoblastos (Drake y Khosla, 2013). Cuando hay una disminución en los niveles de estrógeno, como lo es en las mujeres menopaúsicas, el equilibrio RANKL/OPG se pierde, favoreciendo la diferenciación y actividad de los osteoclastos.

De forma similar al estrógeno, la testosterona tiene un efecto inhibitorio de la resorción ósea, al inhibir la osteoclastogénesis. Posiblemente, parte de este efecto podría atribuirse a la aromatización de la testosterona a estrógenos (Michael et al., 2005). En estudios *in vitro*, se ha encontrado que la testosterona puede inducir la proliferación de los osteoblastos, además de disminuir su apoptosis (Kasperk et al., 1989). Actualmente existe poca investigación sobre el efecto de la testosterona en el mantenimiento de la integridad ósea.

El calcio es necesario para mantener la integridad ósea, sin embargo, aunado al envejecimiento hay una disminución en su captación, la cual en condiciones normales ya es baja. Una ingesta inadecuada de calcio da como resultado una menor concentración de calcio circulante, una mayor secreción de hormona paratiroidea, y con ello un incremento en la resorción ósea. Otro factor que puede contribuir con la deficiencia en la absorción de calcio es la pérdida de receptores intestinales de vitamina D, la vitamina D está relacionada con la absorción de calcio y fósforo en el intestino (Raisz, 2005; Dawson, 2013).

1.1.4.3 Tratamientos para la Osteoporosis

El principal objetivo de las terapias diseñadas para el tratamiento de la osteoporosis, es reequilibrar las fases de la remodelación ósea. Dentro de los fármacos antirresortivos empleados se encuentran los bifosfonatos, que inducen apoptosis en los osteoclastos. Otros como el denosumab, un anticuerpo anti-RANKL y los moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERM), inhiben el reclutamiento de osteoclastos al área de resorción (Harslø y Langdahl, 2016; Cawthray et al., 2017). La teriparatida y la abaloparatida, son presentaciones recombinantes de la hormona paratiroidea y de la proteína relacionada a la hormona paratiroidea respectivamente, y son los únicos agentes anabólicos aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) para el tratamiento de la osteoporosis (Figura 4). La frecuencia en la administración de los medicamentos anabólicos determina el efecto, es decir, la administración

intermitente favorece la formación ósea al aumentar los osteoblastos, mientras que la administración continua conduce a un incremento de osteoclastos (Cawthray et al., 2017).

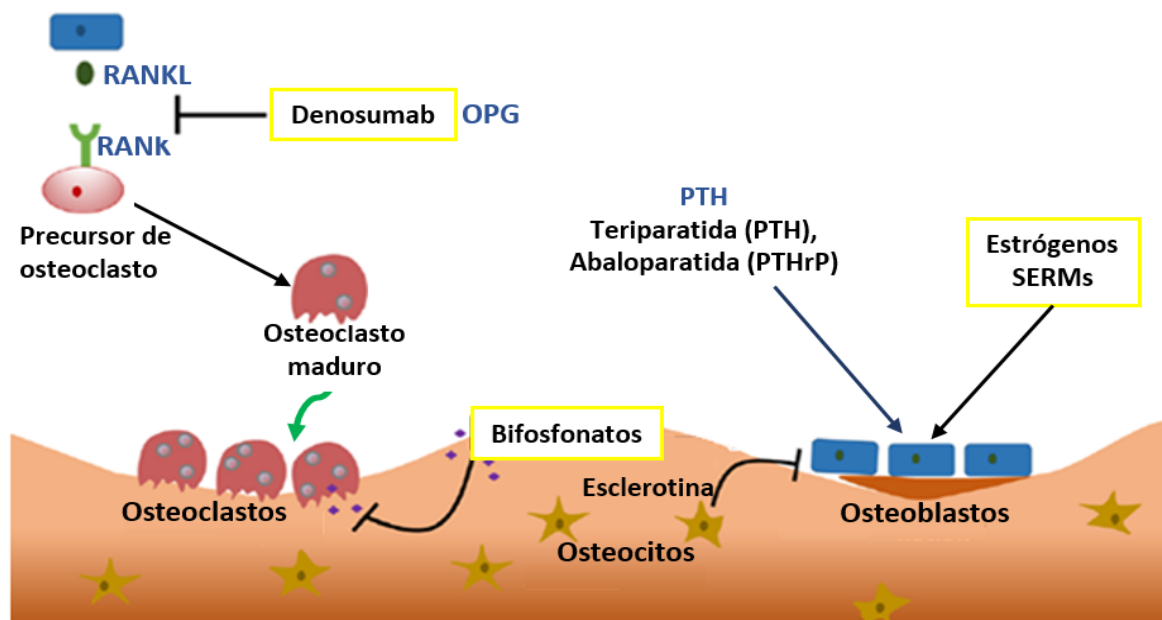


Figura 4. Terapias para la osteoporosis. Representación esquemática de los factores que influyen en el proceso de la remodelación ósea. La diferenciación de los osteoclastos es un proceso que puede ser inhibido por SERMs y Denosumab. La diferenciación y maduración de los osteoblastos es potenciada por PTH y estrógenos, además de la administración de fármacos anabólicos como Teriparatida y Abaloparatida. Receptor activador del factor nuclear $\kappa \beta$ (RANK), ligando de RANK (RANKL), osteoprotegerina (OPG), hormona paratiroidea (PTH), moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERMs). Modificado de Cawthray *et al.*, 2017.

Entre las desventajas que presentan los tratamientos actuales para la osteoporosis se encuentran, que los tratamientos antirresortivos disminuyen la cantidad de osteoclastos existentes, reduciendo posteriormente la síntesis de hueso por los osteoblastos. Esta reducción en la resorción puede incrementar la fragilidad y la acumulación de zonas dañadas en la estructura ósea, aumentando el riesgo de sufrir fracturas. Aunado a lo anterior el uso de bifosfonatos durante periodos prolongados (diez años o más), se ha asociado con un incremento del riesgo de fracturas, principalmente en el cabeza del fémur y osteonecrosis mandibular. Por otro lado, aún se desconocen las consecuencias óseas no deseadas por el uso prolongado de denosumab (McClung, 2013; Harslø y Langdahl, 2016; Cawthray et al., 2017). Finalmente, la administración intermitente de la teriparatida estimula la formación ósea, pero eventualmente tendrá un efecto sobre los osteoclastos, en algunos pacientes con masa ósea muy baja o

respuesta subóptima a la teriparatida, después del tratamiento permanece una densidad mineral ósea baja (Harslø y Langdahl, 2016).

Para lograr un mejor efecto de los agentes terapéuticos empleados en el tratamiento de la osteoporosis es necesario incrementar su especificidad, entender su mecanismo de acción así como disminuir los efectos sistémicos. Actualmente los tratamientos para la osteoporosis únicamente permiten detener la progresión de la enfermedad mas no curarla, por ello es importante seguir en la búsqueda de nuevas terapias así como dilucidar la fisiopatología de la osteoporosis.

1.1.5 Modelos de estudio para regeneración ósea

Para comprender los mecanismos involucrados en la remodelación ósea, ya sea en condiciones normales o patológicas, es necesario recrear estos eventos en modelos que representen la condición humana, estos modelos pueden ser *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

1.1.5.1 Modelos *in vitro*

Para realizar investigación empleando modelos *in vitro* de células óseas es común tener que hacer una elección entre emplear cultivos primarios y/o cultivos de líneas celulares (por ejemplo líneas del repositorio de células del "American type culture collection", ATCC). Una de las principales ventajas de utilizar líneas celulares es la disponibilidad casi inmediata de una gran cantidad de células, dado que el cultivo primario toma más tiempo, sin riesgo de contaminación con células de otros tejidos, y con características fenotípicas estables. Sin embargo, la línea celular puede no ser totalmente representativa, dado que la selección clonal generalmente favorece a las células que crecen rápidamente. Una ventaja de emplear cultivos primarios de células es que pueden expresar un fenotipo más estable y representativo (Bakker y Klein-Nulend 2012) del tejido en estudio.

Peck et al. (1964), establecieron un modelo de cultivo primario de osteoblastos, las células obtenidas fueron viables; sin embargo, la metodología no permitió eliminar células con características de fibroblastos. En la actualidad, tomando como base el modelo de Peck y colaboradores, se ha logrado aislar células precursoras de osteoblastos e inducir su diferenciación o aislar osteoblastos bien definidos (Bakker

y Klein-Nulend, 2012). Además, del cultivo de osteoblastos, la capacidad de cultivar osteoclastos *in vitro* es una herramienta básica. En el pasado, la única manera de estudiar estas células era extrayéndolas como células diferenciadas de los huesos fragmentados de animales neonatos. En 1988, Takahashi y colaboradores establecieron el primer modelo de cultivo de osteoclastos al encontrar que era posible inducir la diferenciación de preosteoclastos en un co-cultivo de células de bazo de ratón y osteoblastos, tras a la adición de 1,25-dihidroxitamina D3. Actualmente las optimizaciones pertinentes a protocolos como el de Takahashi y colaboradores han permitido aislar células diferenciadas como osteoclastos de huesos largos o calvarias, o inducir la diferenciación *in vitro* de células precursoras de osteoclastos a osteoclastos (Marino et al., 2014).

1.1.5.2 Modelos *in vivo*

Los ratones no tienen un equivalente a la menopausia, pero es posible generar en ellos un estadio similar a la osteoporosis mediante inducción química o quirúrgica (Sophocleous e Idris, 2014). En 1994, Flaws y colaboradores, indujeron un proceso similar a la menopausia al inocular ratones hembra con 4-vinilciclohexeno diepóxido (VCD), mientras que Goulding y Gold (1989), emplearon la buserelina. La ovariectomía (OVX), es una técnica quirúrgica que consiste en la remoción de los ovarios. Un estudio realizado por Wright y colaboradores (2008) comparó los efectos generados en el sistema óseo por OVX y el uso de VCD, encontrando que en el modelo de VCD los cambios óseos aparecen de forma más lenta y son de menor magnitud. Aunque la ovariectomía tiene relevancia limitada para estudios de pre- y postmenopausia, sigue siendo una herramienta valiosa y es la más ampliamente utilizada para la investigación de compuestos activos con potencial como agentes terapéuticos para padecimientos óseos como la osteoporosis (Sophocleous e Idris, 2014).

De forma similar a la ovariectomía, el modelo de orquiectomía (ablación de los testículos) permite evaluar el efecto de la deficiencia de andrógenos en el sistema óseo. Erben y colaboradores (2000) reportaron que los efectos óseos son similares después de la orquiectomía en ratas macho, a los inducidos por ovariectomía en ratas hembra.

1.2 Justificación

El sistema óseo cumple con una gran diversidad de funciones que contribuyen a la homeostasis del organismo, y como cualquier otro componente del cuerpo humano es susceptible de padecer diversas patologías, entre ellas la osteoporosis. Una enfermedad que afecta a más de 200 millones de personas en todo el mundo, principalmente adultos mayores, y que se caracteriza por un desequilibrio en los sistemas que regulan la remodelación ósea.

Para comprender los mecanismos involucrados en la remodelación ósea, ya sea en condiciones normales o patológicas, es necesario la implementación de modelos que permitan recrear en el laboratorio los eventos de la condición humana, así como evaluar compuestos con potencial terapéutico para tratar patologías. Dado que los tratamientos existentes son paliativos es importante seguir en la búsqueda de terapias que permitan revertir el proceso y no solo detener la progresión de la osteoporosis.

1.3 Hipótesis

El establecimiento de un modelo *in vitro* y *ex vivo* de osteoclasto- y osteoblastogénesis a partir de líneas celulares y células de medula ósea de ratón, respectivamente, así como un modelo *in vivo* de osteoporosis, permitirán recrear las condiciones óseas apropiadas para el estudio de la remodelación ósea.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Implementar un modelo *in vitro* y *ex vivo* de osteoclastogénesis y osteoblastogénesis, así como un modelo *in vivo* de osteoporosis, para el estudio de la remodelación ósea.

1.4.2. Objetivos específicos

1. Establecer un modelo osteoclastogénesis a partir de células de médula ósea y de la línea celular RAW264.7.
2. Implementar un modelo de osteoblastogénesis a partir de células aisladas de calvarias de ratón y de la línea celular MC3T-E1.
3. Establecer un modelo *in vivo* de osteoporosis para evaluar la remodelación ósea.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Modelos de osteoclastogénesis

2.1.1 Diferenciación de la línea celular RAW264.7 a osteoclastos

La línea celular RAW264.7 ATCC, amablemente donadas por la Dra. Teresa Guise del Departamento de Medicina de *Indiana University School of Medicine*. Corresponden a macrófagos de ratón transformados e inmortalizados por el virus de leucemia murina de Abelson. Las células fueron cultivadas en una placa de Petri de 10 cm, empleando medio *Minimum Essential Medium Alpha 1X* (α -MEM 1X, Corning), suplementado con suero fetal bovino (FBS, Biowest) al 10% y solución de antibiótico/antimicótico 1% (Ab/Am, penicilina G, estreptomycin y amfotericina B, Corning), e incubadas a 37 °C en atmósfera de 5% CO₂. Una vez alcanzada una confluencia del 80%, se realizó conteo de células. Para ello, se removió el medio de cultivo, la monocapa celular fue lavada con PBS 1X estéril (pH 7.4), y con “cell scraper” se separaron las células de la placa de cultivo, las células fueron resuspendidas en 3 ml de medio de cultivo. Se tomaron 20 μ l de la suspensión celular, 20 μ l de azul tripano 1X (Sigma) fueron adicionados, se homogenizaron los 40 μ l, de los cuales se cargaron 15 μ l en la cámara de Neubauer, y se procedió a realizar el conteo celular. En placa de 96 pozos se sembraron por a una densidad de 1×10^4 (grupo control n=3, grupo en diferenciación n=3) o 5×10^3 células/200 μ l (grupo control n=3, grupo en diferenciación n=3). El medio de cultivo α -MEM 1X (FBS al 10%, Ab/Am 1%) se suplementó con RANKL murino (PreproTech) 30ng/ml para los grupos en diferenciación. El medio de cultivo fue renovado cada dos días durante 7 días, en todos los grupos.

2.1.2 Extracción de médula ósea y diferenciación a osteoclastos

Los ratones BALB/c fueron obtenidos a partir de cruces realizadas en el laboratorio del Departamento de Innovación Biomédica del CICESE. El manejo de los ratones se realizó conforme a la norma mexicana NOM-062-Z00-1999. Los ratones se mantuvieron en grupos de 4 hembras en cajas (34.3cm largo x 29.2cm de ancho x 15.5cm de alto) con cama de aserrín (grado laboratorio, Teklad) en el sistema optimice (Animal Care Systems). Cada 7 días se renovó el agua de los bebederos y cada 15 días se llevó a cabo el cambio de caja. La temperatura del cuarto donde se encuentran los ratones es de 24°C, con

ciclos de luz y oscuridad controlados de 12 horas. El alimento sólido (dieta para roedores 18% proteína, Teklad) y agua se suministraron *ad libitum*. La disección de huesos se realizó bajo condiciones estériles.

Los ratones fueron sacrificados mediante sobredosis de pentobarbital (Pisa) seguido de dislocación cervical. Inmediatamente después, se colocaron en etanol al 70% y se procedió a realizar la disección con material estéril. En primer lugar se extrajeron las piernas, retirando la mayor cantidad posible de músculo, posteriormente se separó la pierna entre fémur y tibia, ambos huesos se colocaron en una caja Petri de 10 cm con 10 ml de PBS 1X estéril adicionado previamente. Para la extracción de médula ósea, se perforó cada hueso, por ambos extremos con una jeringa de 31 G x 8 mm (insulina), con una jeringa distinta se inyectó PBS 1X estéril por cada extremo. La médula ósea de los huesos se recolectó en un tubo estéril de 15 ml, y fue centrifugada a 350 g durante 8 minutos a 4 °C, el sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió en 5 ml de buffer de lisis de glóbulos rojos 1X (Biolegend), la suspensión se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos, a continuación se adicionaron 3 ml de PBS 1X estéril, y se centrifugó nuevamente a 350 g durante 8 minutos a 4 °C, el sobrenadante fue descartado y el pellet resuspendido en 3 ml del medio de cultivo correspondiente para realizar conteo celular con azul tripano 1X.

Las células de médula ósea se sembraron por triplicado a una densidad de 2×10^4 células/200 μ l, tanto para el grupo control como para los que serían diferenciados, en placa de 96 pozos. Al medio de cultivo α -MEM 1X suplementado con FBS al 10%, Ab/Am 1%, L-glutamina 2 mM (Corning), se le adicionó Factor estimulante de colonias de macrófagos murino 50ng/ml de (μ M-CSF, PreproTech), y RANKL murino 50ng/ml para el grupo de diferenciación 1 y 100ng/ml para el grupo de diferenciación 2 (PreproTech). Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Se consideró que cada 48 horas RANKL y M-CSF se agotaban del medio, por tanto cada dos días se realizó el cambio de medio a todos los grupos, durante 9-10 días, tiempo suficiente para observar osteoclastos.

2.1.3 Caracterización de las células diferenciadas a osteoclastos

Para evaluar la actividad así como morfología de las células, se realizó la tinción de la fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP) empleando el kit *Acid Phosphatase, Leukocyte* (Sigma), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Las células teñidas se observaron y cuantificaron empleando un microscopio de campo claro. Se contaron las células grandes, multinucleadas (3 o más núcleos), TRAP positivas.

2.2. Modelos de osteoblastogénesis

2.2.1 Diferenciación de la línea celular MC3T3-E1 a osteoblastos

La línea celular MC3T3-E1 ATCC, son preosteoblastos aislados de huesos de calvaria de ratón. Las células MC3T3.E1 se cultivaron en medio *Minimum Essential Medium Alpha* sin ácido ascórbico (α -MEM, Caisson) suplementado con FBS 10% (Biowest) y solución de antibióticos/antimicótico 1% (Corning), las células se incubaron a 37 °C en atmósfera de 5% CO₂. Al llegar a una confluencia del 80-85%, se realizó el conteo de células, para ello se retiró el medio de cultivo, la monocapa celular se lavó con PBS 1x estéril, se agregó solución de tripsina (0.05%)/EDTA (0.53 mM), y se incubó las células a 37 °C durante 2 minutos, posteriormente se neutralizó la reacción con medio α -MEM suplementado. Para inducir la diferenciación, las células se sembraron por triplicado como grupo control y grupo para diferenciación, a una densidad de 5×10^3 células/200 μ l en placa de 96 pozos. El medio de cultivo para diferenciación consistió en medio α -MEM (FBS al 10% y Ab/Am al 1%) al cual se le adicionó ácido ascórbico 50 μ g/ml (Sigma) y β -glicerofosfato 10 mM (Sigma). Las condiciones de cultivo fueron a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂. El medio de cultivo fue renovado cada tres días, durante 21 días en ambos grupos.

2.2.2. Aislamiento de células de calvarias de ratones neonatos y diferenciación a osteoblastos

Los ratones neonatos fueron obtenidos a partir de cruces realizadas en el laboratorio del Departamento de Innovación Biomédica, entre ratones de la cepa BALB/c. El manejo de los ratones se realizó de acuerdo a lo establecido en la norma mexicana NOM-062-Z00-1999.

Las calvarias fueron obtenidas de ratones de 5-6 días de edad. El procedimiento se realizó en condiciones estériles en su totalidad. Los ratones fueron sumergidos brevemente en etanol al 95% y posteriormente se sacrificaron por decapitación. La cabeza se colocó en una caja Petri con PBS 1X para conservar el tejido. Primeramente el cuero cabelludo se retiró para exponer la calvaria, se realizó un corte siguiendo la sutura lambdoide, posteriormente se cortó siguiendo una línea recta desde el extremo derecho de la sutura lambdoide hacia la sutura coronal, de este punto se realizó un corte nuevamente hacia el centro medio de la frontanela anterior, el procedimiento se repitió del lado izquierdo. Con ayuda de pinzas finas se retiró la calvaria y empleando bisturí se retiró el tejido remanente adherido así como las meninges, las calvarias disecadas se colocaron en PBS 1X.

Las calvarias se transfirieron a un tubo estéril de 15 ml con 4 ml de solución de digestión. La solución de digestión consta de 1 ml de solución de tripsina-EDTA (0.05%/0.53 mM), 2.5 mg de colagenasa II (colagenasa de II *Clostridium histolyticum*, Sigma) más 4 ml de PBS 1X. La digestión se realizó en agitación constante (70-80 rpm) a 37 °C durante 20 minutos. Transcurrido el tiempo se desechó la solución de digestión y se adicionaron nuevamente 4 ml. Se realizaron un total de 5 digestiones, recuperando el sobrenadante de las digestiones 3 a 5, al sobrenadante se le adicionó medio α -MEM (FBS al 10% y Ab/Am al 1%) para inactivar la tripsina. La suspensión de células se recuperó en un tubo de 50 ml, se centrifugaron a 800 g por 5 minutos, y el pellet se resuspendió en 3ml de medio α -MEM (FBS al 10% y Ab/Am al 1%), y se procedió a sembrar 1 ml de la suspensión de células en placas de Petri de 10 cm. Las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ hasta llegar a confluencia de 70-80%.

Las células aisladas de calvarias se sembraron por triplicado grupo control y grupo para diferenciación a una densidad de 5,000 células/200 μ l en placas de 96 pozos, en medio α -MEM (FBS al 10% y Ab/Am al 1%). Después de 18 horas se reemplazó el medio de cultivo por medio α -MEM (FBS al 10% y Ab/Am al 1%) complementado con ácido ascórbico 50 μ g/ml y β -glicerofosfato 10 mM, en las células para diferenciación. Las condiciones de cultivo fueron a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂. El medio de cultivo se renovó en cada grupo cada tercer día durante 21 días.

2.2.3 Caracterización de las células diferenciadas a osteoblastos

Al concluir el periodo de diferenciación/maduración las células fueron caracterizados mediante tinción de fosfatasa alcalina empleando el kit Leukocyte Alkaline Phosphatase (Sigma), para evaluar la actividad de mineralización de las células se empleó la tinción Alizarin Red S (Sigma), de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

2.3 Establecimiento del modelo murino de osteoporosis

2.3.1 Manejo y cuidado de ratones

Los ratones BALB/c fueron obtenidos a partir de cruza realizadas en el laboratorio del Departamento de Innovación Biomédica del CICESE. Los ratones hembra C57BL/6 tenían 6 de edad

semanas cuando arribaron a nuestras instalaciones provenientes de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio de la Universidad Autónoma Metropolitana (UPEAL-UAM). Los ratones se mantuvieron en grupos de 4 hembras en cajas (34.3cm largo x 29.2cm de ancho x 15.5cm de alto) con cama de aserrín (grado laboratorio, Teklad) en el sistema optimice (Animal Care Systems). Cada 7 días se renovó el agua de los bebederos y cada 15 días se llevó a cabo el cambio de caja. La temperatura del cuarto donde se encuentran los ratones es de 24°C, con ciclos de luz y oscuridad controlados de 12 horas. El alimento sólido (dieta para roedores 18% proteína, Teklad) y agua se suministraron *ad libitum*. El manejo/sacrificio de los ratones se realizó conforme a la norma mexicana NOM-062-Z00-1999.

2.3.2 Ovariectomía

La ovariectomía (OVX) se realizó en hembras BALB/c de 8 semanas (control n=2, OVX n=5) mientras que las hembras C57BL/6 se dividieron en dos grupos. En el primero (control n=3, OVX n=6) se efectuó la cirugía a las 8 semanas de edad mientras que en el segundo grupo (control n=3, OVX n=5) hasta las 16 semanas, con el fin de comparar la pérdida ósea. Las hembras de cada grupo de 8 y 16 semanas fueron sedadas con anestesia (ketamina/xilacina) 5µL/g y se utilizó buprenorfina (5 µL/g) como analgésico. Una vez inconscientes se les colocó crema humectante de ojos para evitar la resequedad ocular durante el procedimiento. Posteriormente, se procedió a rasurar la espalda de los roedores, el área depilada se limpió con PBS 1X estéril. En la campana de flujo laminar horizontal se colocó un tapete térmico (37°C) sobre el cual se procedió a realizar la cirugía con material estéril. Primeramente se hizo una incisión en el costado derecho cortando piel y tejido muscular, una vez dentro se procedió a buscar el ovario, al localizarlo se sostuvo con pinzas y se amarró el oviducto con Catgut (Atramat) y el ovario fue cortado (Figura 5). Se reintrodujo correctamente el oviducto y tejido adiposo, el músculo se unió por presión, la herida externa se limpió nuevamente con PBS 1X, se secó con gasa estéril y se colocó steri-strip (3M) para cerrar la herida. El procedimiento se repitió en el lado izquierdo. Para evitar la deshidratación se administraron 200µl vía intraperitoneal de solución salina estéril a 37°C. Los roedores se mantuvieron en el cojín térmico hasta que

despertaron, una vez conscientes se colocaron en cajas limpias, a las 12 horas postoperatorias se administró otra dosis de analgésico durante 3 días.

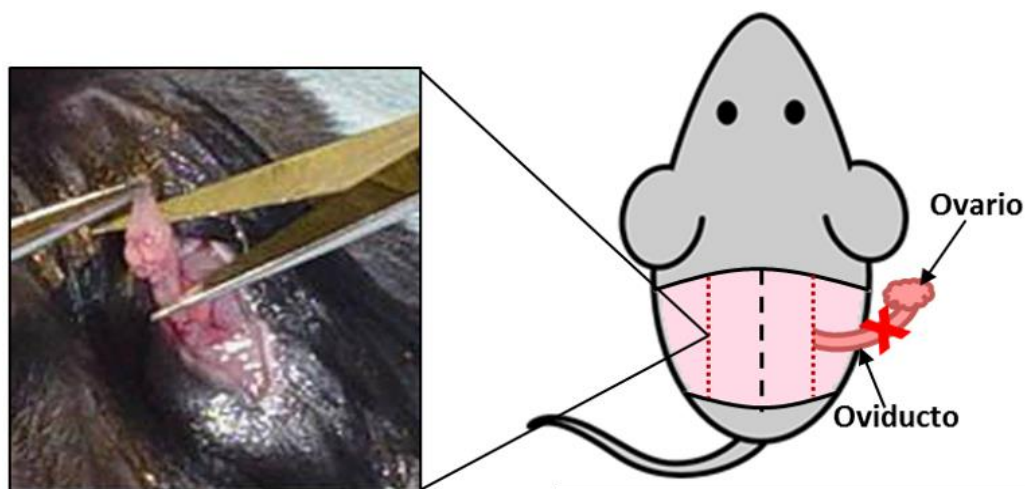


Figura 5. Ilustración esquemática de ovariectomía con doble incisión dorso lateral (Imagen modificada de Lab mouse template clip art y Sophocleous e Idris, 2014. BoneKey reports).

Durante la primera semana después de la ovariectomía se observó diariamente a los ratones para detectar signos de dolor o angustia. Un mes después de realizada la cirugía los ratones fueron sacrificados. La pierna derecha se conservó en etanol al 95% a 4 °C, por si era posible analizarla mediante nanotomografía computarizada (nCT). Mientras que la pierna izquierda se guardó en formalina, destinados para histología, los húmeros de cada ratón se colocaron en un criotubo con 500 µL de Trizol e inmediatamente fueron almacenados a -80 °C hasta realizar la extracción de ARN.

2.3.3 Evaluación del modelo mediante histología

Las piernas izquierdas extraídas se limpiaron con bisturí para retirar la mayor cantidad de músculo, posteriormente se sometieron a un proceso de descalcificación. Para ello, las piernas fueron fijadas con formalina tamponada neutra al 10% y almacenadas a 4 °C durante 48 horas, después se realizó un lavado con PBS 1X durante 16 horas a 4 °C. Una vez transcurrido el tiempo las muestras fueron desmineralizadas empleando una solución de EDTA 10% pH 8, durante 15 días realizando cambios de la solución cada 3 días, las muestras se mantuvieron a 4 °C durante el proceso. Finalizada la etapa de desmineralización las

muestras se lavaron nuevamente con PBS 1X durante 16 horas a 4 °C. Finalmente las muestras se colocaron en etanol 70% hasta realizar la tinción de hematoxilina-eosina.

El procesamiento histológico de las muestras fue el siguiente: los tejidos fueron sumergidos para ser deshidratados en etanol al 96% y 100%, xileno al 100%, y embebidos en parafina fundida. Una vez solidificada la parafina se realizaron cortes de 7 µm en micrótopo. Los cortes fueron transferidos a un baño de agua con gelatina, colocados en portaobjetos e incubados en una estufa a 60 °C durante 20 minutos. El tejido en laminillas se rehidrató tras ser sumergido en una serie que consistió en xileno al 100% (5 minutos x2), etanol 100, 70 y 50% (durante 1 minuto en cada solución), y por último agua. Las laminillas se tiñeron con hematoxilina durante 20 segundos, se enjuagaron con agua, se sumergieron en etanol ácido por 1.5 minutos y después en una solución saturada de carbonato de litio por 2 minutos. Se enjuagaron nuevamente con agua, para ser sumergidas en etanol al 96%, después las laminillas fueron teñidas con eosina-orange g por 1 minuto. Finalmente los tejidos fueron deshidratados nuevamente con etanol al 96 y 100%, y colocados en xileno por 5 minutos. A cada tejido se le adicionó medio de montaje no acuoso y se les colocó un cubreobjetos. Las muestras fueron observadas en microscopio de campo claro para la obtención de imágenes representativas.

2.3.4 Evaluación por PCR cuantitativa en tiempo real

2.3.4.1 Extracción de RNA

Los humeros recolectados y almacenados a -80 °C, se descongelaron en hielo, a cada tubo se le adicionó una perla de 1/4" recubierta de óxido de zirconio (MP BIOMEDICALS), y se procedió a realizar la homogenización del tejido empleando el equipo FastPrep-24 (MP BIOMEDICALS). El proceso de homogenización consistió en 4 ciclos de 30 segundos con una velocidad de 6.0m/s cada uno, las muestras se colocaron en hielo 5 minutos entre cada ciclo. La extracción de ARN se realizó con una combinación del protocolo de Trizol y del protocolo del kit *GenElute Mammalian Total RNA Miniprep* (Sigma). De acuerdo al protocolo de extracción con Trizol, después de homogeneizar el tejido las muestras se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente, para permitir la disociación de complejos nucleoproteicos, posteriormente las muestras se centrifugaron a 12,000 g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, se adicionaron 200 µl de cloroformo por mililitro de Trizol y se mezcló agitando vigorosamente por 15 segundos, para posteriormente incubar durante 3 minutos a temperatura ambiente

y continuar con una centrifugación a 12,000 g durante 15 minutos a 4°C. La fase clara obtenida se transfirió a un tubo nuevo, y se les accionó 500 µL de etanol al 70%. La mezcla en etanol se pasó a través de la columna de unión del kit a partir de este paso se continuó con el protocolo del kit conforme a las instrucciones del fabricante, realizando el paso opcional de tratar las muestras con DNasa (QIAGEN, 5 µL de DNasa + 35 µL del buffer para DNasa). Mediante espectrofotometría, haciendo uso del equipo Nanodrop LITE (Thermo Scientific) se cuantificó la concentración del RNA (a 260 nm). La integridad y el tamaño se evaluaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Las muestras de RNA fueron almacenadas a 80°C, hasta su posterior uso.

2.3.4.2 Retrotranscripción del RNA

A partir del RNA total se realizó PCR de transcriptasa inversa para formar el DNA complementario. Para ello se realizaron dos mix para cada reacción, el mix 1 contenía por reacción 2.5 ng de RNA, 1 µl de dNTP's 10 mM (Promega), 1 µl de Oligo dT (Thermo scientific), y se complementó con agua libre de nucleasas (Thermo scientific Ambion) para tener un volumen de 13.7 µl por reacción, el mix 1 se colocó en el termociclador a 65°C durante 5 minutos. Posteriormente se adicionó a cada muestra el mix 2 que contenía 4 µl de First-Strand buffer (Invitrogen), 2 µl de DTT 0.1 M (Invitrogen) y 1.0 µl de enzima Super Script II (Invitrogen), la reacción fue incubada a 42°C durante 75 minutos, para completar la transcripción, y 15 minutos a 70°C. Por último, de los 20 µl de la reacción total se tomaron 10 µl, mismos que fueron diluidos con 40 µl de agua (Dilución 1). Las muestras fueron almacenadas a -20°C.

2.3.4.3 Evaluación de la expresión de genes mediante RT-qPCR

El DNAc obtenido se empleó para realizar PCR cuantitativa en tiempo real y evaluar la expresión de genes asociados a la remodelación ósea en ratones con ovariectomía y ratones control. El mix de la RT-qPCR contenía por reacción 1.7 µl de agua libre de nucleasas, 0.4 µl de oligo en dirección 5' (forward primer), 0.4 µl de oligo antisentido (reverse) y 5 µl de QuantiTect SYBER Green. Cada dilución 1 fue diluida nuevamente, se tomaron 20 µl y se les adicionaron 30 µl de agua libre de nucleasas (dilución 2, de trabajo). En cada pocillo en placas de 96 pozos (Axyogen) se colocaron 2.5 µl de cDNA dilución 2 y 7.5 µl del mix, cada muestra se pipeteó por triplicado, la placa se cubrió con una película de plástico y se centrifugó a 4°C

durante 1 minutos a 1000 g. El PCR cuantitativo se realizó en el termociclador *Applied Biosystems*, empleando el software 7500 v2.0.6, donde se programaron un total de 40 ciclos. Los genes asociados a remodelación ósea que se evaluaron fueron: el ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B (*RANKL*), osteoprotegerina (*OPG*), factor de transcripción relacionado a Runt 2 (*RUNX2*), fosfatasa alcalina (*ALPL*), catepsina K (*CTSK*), metaloproteinasa 13 (*MMP13*), fosfatasa ácida tartrato resistente (*TRAP*), proteína ribosomal L32 (*RPL32*) (Tabla 1). Los resultados fueron normalizados con el nivel de expresión de *RPL32*. Este gen codifica para la Proteína Ribosomal L32, componente de la subunidad 60S del ribosoma.

Tabla 1. Secuencias de primers empleados en las reacciones de RT-qPCR.

Nombre del gen	Secuencia dirección 5'	Secuencia antisentido
<i>RANKL</i>	CCAAGATCTCTAACATGACG	CACCATCAGCTGAAGATAGT
<i>OPG</i>	AGAGCAAACCTTCCAGCTGC	CTGCTCTGTGGTGAGGTTTCG
<i>RUNX2</i>	GGCACAGACAGAAGCTTGATGA	GAATGCGCCCTAAACTACTGA
<i>ALPL</i>	CACAGATTCCCAAAGCACCT	GGGATGGAGGAGAGAAGGTC
<i>CTSK</i>	GAGGGCCAACCTCAAGAAGAA	GCCGTGGCGTTATACATACA
<i>MMP13</i>	AGGAGACGGAGGTGATCATCATTG	GTCCCATGGCGTCTGAAGA
<i>RPL32</i>	CAGGGTGCGGAGAAGGTTCAAGGG	CTTAGAGGACACATTGTGAGCAATC

2.4 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con el software estadístico GraphPad Prism 5, utilizando la prueba estadística U de Mann-Whitney, la prueba estadística no pareada t test y la prueba estadística de Test de Bonferroni. Se consideró un valor de $p < 0.05$ como significativo.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Establecimiento de modelos de osteoclastogénesis

3.1.1 Diferenciación de células RAW264.7 a osteoclastos

Las células RAW264.7 fueron sembradas en placas de 96 pozos a densidades de 5×10^3 células y 1×10^4 células en 200 μ l, dado que densidades altas o bajas pueden inhibir la diferenciación. El proceso de osteoclastogénesis se indujo suplementado el medio de cultivo α -MEM 1X con RANKL a una concentración de 30 ng/ml. Cada dos días se realizó cambio de medio de cultivo durante 9 días. Al finalizar el ensayo se realizó la tinción TRAP para identificar células grandes, multinucleadas y de un color rosa intenso-morado.

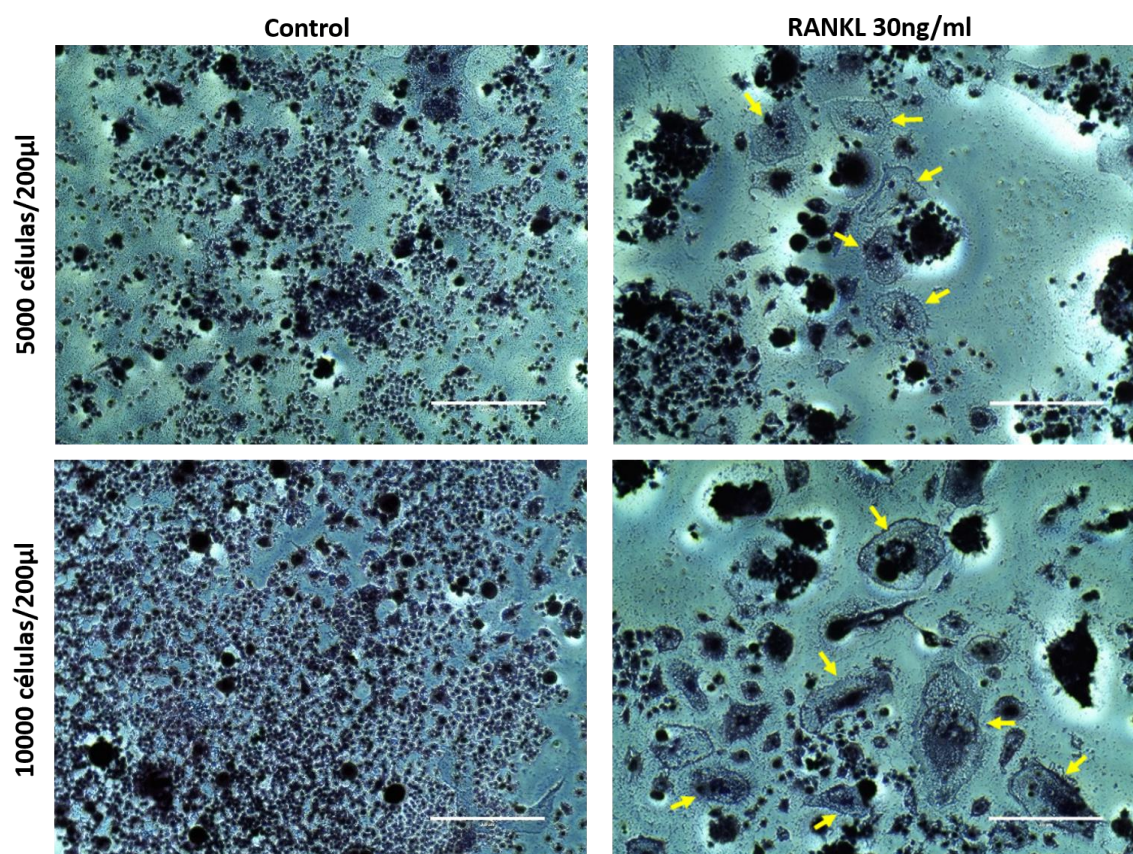


Figura 6. Tinción TRAP en RAW264.7 diferenciadas. Las células RAW264.7 fueron cultivadas a dos densidades distintas en presencia de RANKL (30ng/ml) para inducir su diferenciación a osteoclastos. Las flechas amarillas indican osteoclastos. Barra 200 μ m

Los resultados del ensayo indicaron que RANKL a una concentración de 30ng/ml después de 7 días de cultivo, indujo la formación de células grandes, de 3 o más núcleos, es decir osteoclastos (indicados por flechas amarillas) a partir de las células RAW264.7, en ambas condiciones de densidad celular (Figura 6). No se observaron células con las características previamente descritas en las células RAW264.7 no tratadas. Sin embargo, el uso Hematoxilina de Gill No. 3 como contratinción impidió observar las células TRAP positivas así como cuantificarlas.

Posterior al primer experimento de diferenciación se presentaron problemas en el cultivo de las células RAW264.7, se desprendían de la placa de cultivo y no se adherían nuevamente. De acuerdo a las indicaciones recomendadas por la *American Type Culture Collection* el medio RPMI 1640 puede ser empleado también para el mantenimiento de esta línea celular. Por tanto se activaron nuevas células RAW264.7 y se mantuvieron en medio de cultivo RPMI o en α -MEM 1X. Las células cultivadas en RPMI crecieron rápidamente, pero al intentar diferenciar las células que se encontraban en este medio o en α -MEM 1X, no fue posible apreciar osteoclastos después de los 9 días de inducción, solo algunas células mononucleares TRAP positiva (Figura 7).

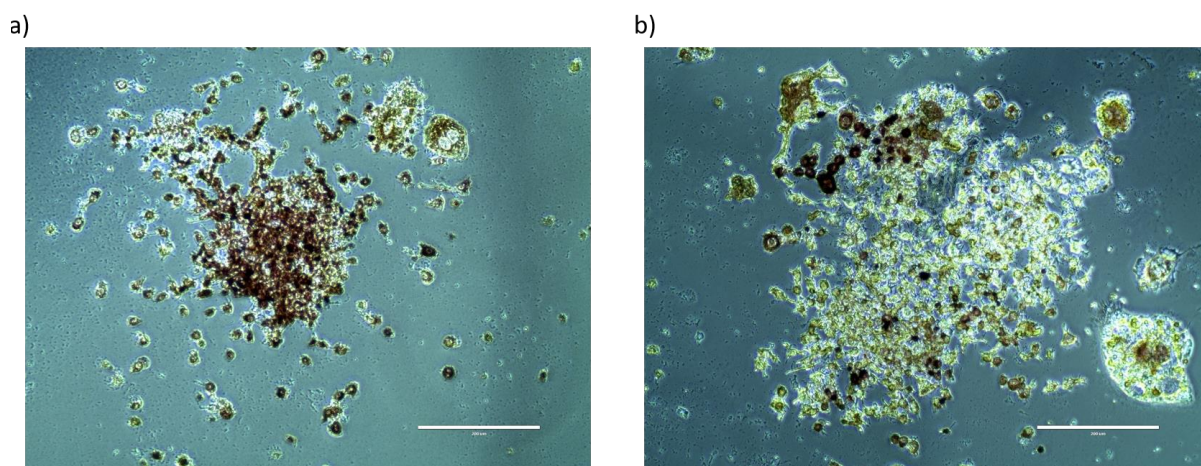


Figura 7. Imágenes representativas de la tinción TRAP en RAW264.7 cultivadas en presencia de RANKL. Las células RAW264.7 se mantuvieron en cultivo en medio (a) α -MEM o (b) RPMI, después de 9 días de inducción, se aprecian células mononucleares TARP positivas. Barra 200 μ m

3.1.2 Diferenciación de células de médula ósea a osteoclastos

La médula ósea se extrajo de huesos largos (fémur y tibia) de ratones BALB/c adultos. Para inducir la diferenciación las células se cultivaron durante 9 días en medio suplementado con M-CSF a una concentración de 50ng/ml, mientras que de RANKL se evaluaron dos concentraciones una de 50ng/ml y la otra de 100ng/ml. Cada dos días se renovó el medio de cultivo. Los resultados obtenidos indicaron que el tratamiento con RANKL (ambas concentraciones) y M-CSF indujo la formación de células grandes, TRAP positivas, multinucleadas (3 o más núcleos); es decir osteoclastos, a partir de las células precursoras presentes en la médula ósea (Figura 8). No se observaron células TRAP positiva en la médula ósea cultivada sin tratamiento.

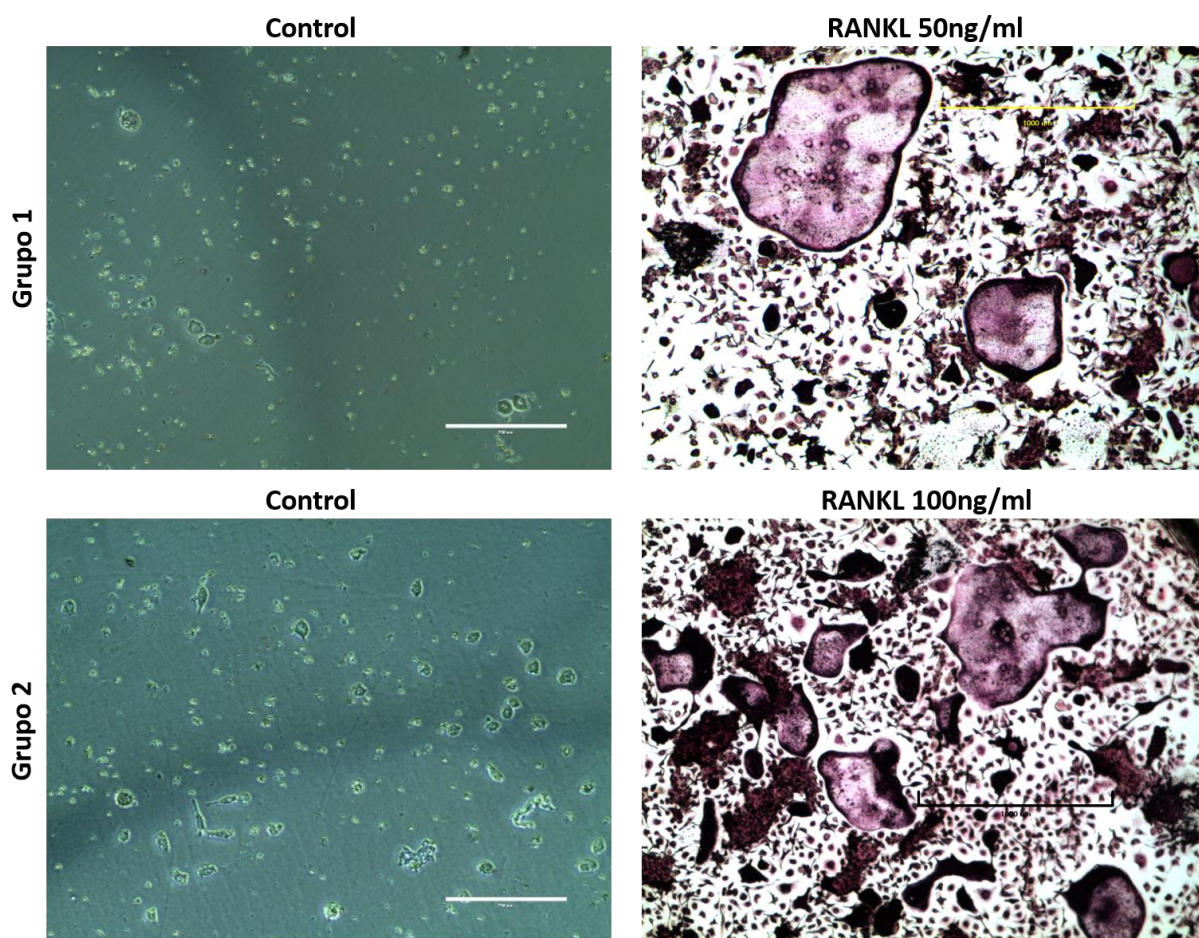


Figura 8. Tinción TRAP en células de médula ósea diferenciada a osteoclastos. Los cultivos de células de médula ósea se dividieron en dos grupos uno fue cultivado en medio α -MEM 1X que contenía 50ng/ml de M-CSF y RANKL a 50ng/ml, mientras que en el grupo dos el medio se complementó con M-CSF a 50ng/ml y RANKL a 100ng/ml. En ambas condiciones el tiempo de diferenciación fue de 9 días. Los osteoclastos se observan como células grandes multinucleadas, con una coloración rosa-morado en el citoplasma. Barra 100 μ m.

También, se determinó el número de células TRAP positivas encontrando que la cantidad de osteoclastos fue dependiente en este ensayo de la concentración de RANKL (Figura 9), en el Grupo 2 (RANKL 100ng/ml) se cuantificó cercano al doble de osteoclastos presentes que en la concentración de 50ng/ml.

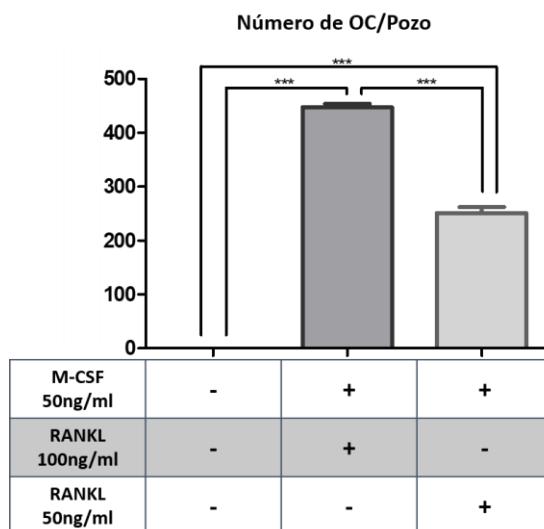


Figura 9. Cuantificación de osteoclastos (OC) diferenciados a partir de células de médula ósea cultivadas en presencia de dos concentraciones distintas de RANKL. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. Prueba estadística ANOVA de una vía con post-test de Tukey. (Los cambios significativos se muestran con asteriscos, *** $p < 0.001$)

3.2 Establecimiento de modelos de osteoblastogénesis

3.2.1 Diferenciación de la línea celular MC3T3-E1 a osteoblastos

La línea celular de preosteoblastos murinos MC3T3-E1 se cultivó en medio α -MEM suplementado con ácido ascórbico (50 μ g/ml) y β -glicerofosfato (10mM), durante 21 días, realizando cambio de medio cada 3 días. Transcurrido el tiempo de diferenciación y maduración de las células se realizaron las tinciones de fosfatasa alcalina (AP) y Alizarin Red. El incremento en la expresión de la fosfatasa alcalina se considera como un indicador en la diferenciación de osteoblastos. Los resultados indican que en las células MC3T3.E1 cultivadas en condiciones de diferenciación hay un incremento en la actividad de la AP determinado por una abundante coloración rosa-morado (Figura 10b y d) en los pozos, mientras que en las células control no se apreció coloración (Figura 10a y c).

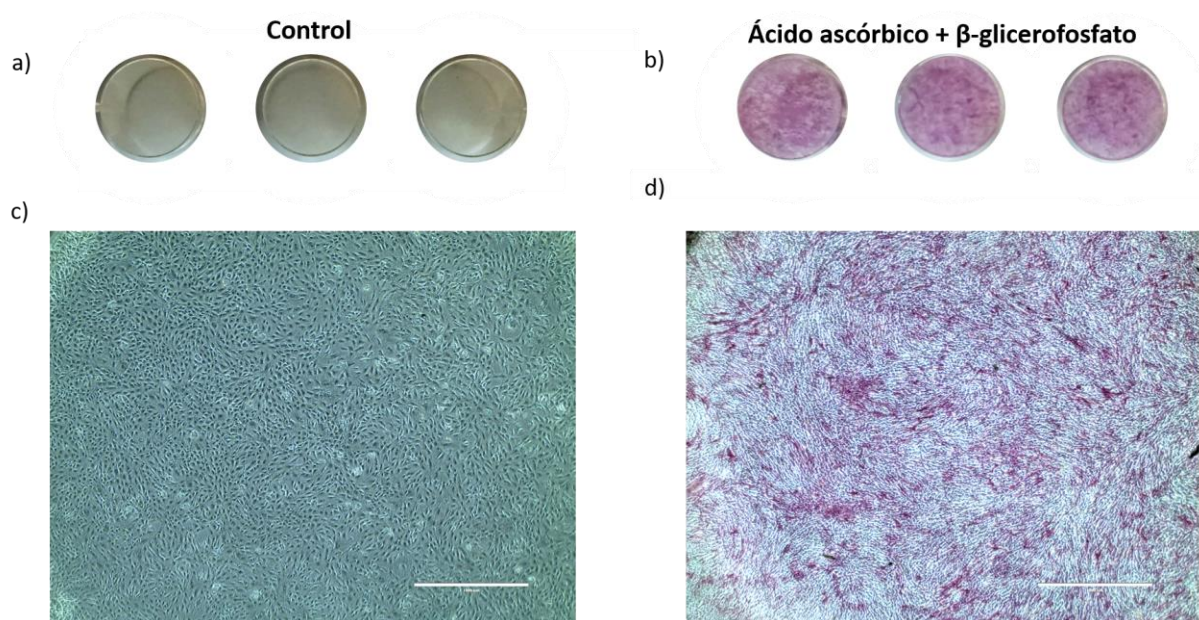


Figura 10. Tinción Fosfatasa Alcalina (AP) en células MC3T3.E1 diferenciadas a osteoblastos empleando ácido ascórbico y β -glicerofosfato. a,c) Células control con tinción AP. b,d) Células AP positivas. Barra 100 μ m

El ensayo de Alizarin Red es un método estándar empleado para observar mineralización (áreas calcificadas) por células osteogénicas. En las áreas positivas se forma un quelato, que se aprecia por la aparición de coloración anaranjado brillante-rojo. En las células control se observó de acuerdo a lo esperado una ligera coloración anaranjada en los pozos teñidos (Figura 11a), al observarse mediante microscopia de campo claro (Figura 11c) la monocapa celular presentó zonas con una ligera coloración amarilla-anaranjado pero sin presencia de áreas mineralizadas. Mientras que en los pozos con células cultivadas en medio ostogénico se observó una tinción similar en intensidad a las células control (Figura 11b), al microscopio se apreciaron dos o tres pequeñas áreas mineralizadas, dispersas en todo el pozo, teñidas de color anaranjado-rojizo (Figura 11d). Sin embargo, de acuerdo a las características de las células MC3T3.E1 al concluir el periodo de diferenciación se esperaba una mayor proporción de áreas calcificadas.

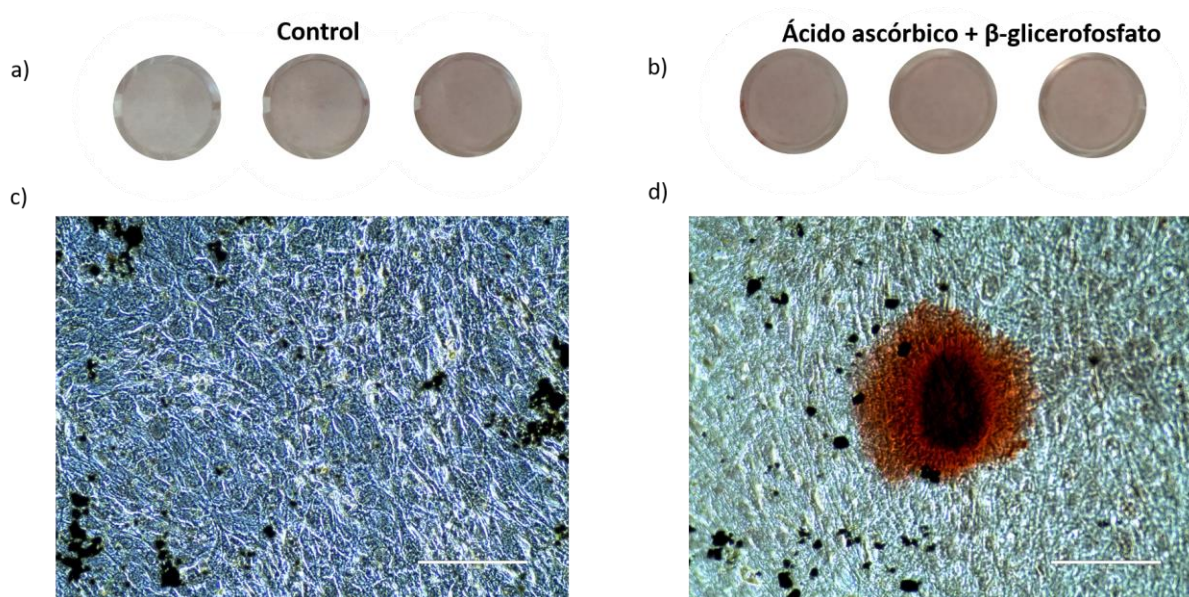


Figura 11. Tinción Alizarin Red en células MC3T3.E1 cultivadas en ausencia (a,c) y presencia (b,d) de ácido ascórbico y β -glicerofosfato. Coloración anaranjado-rojo indica áreas calcificadas. Barra 200 μ m

3.2.2 Cultivo y maduración de osteoblastos aislados de calvarias de ratones neonatos

Las células aisladas de calvarias de ratones neonatos mediante digestión en colagenasa, se mantuvieron en medio de cultivo α -MEM suplementado con ácido ascórbico y β -glicerofosfato para inducir la maduración de las células. Después de 21 días de cultivo en medio de osteogénesis se realizó la tinción de fosfatasa alcalina y Alizarin Red. En la Figura 12a, se puede apreciar la aparición de pequeñas áreas teñidas de un color rosa-morado en los pozos control, al visualizarlos mediante microscopía de campo claro (Figura 12c) se observó que en algunas regiones había células teñidas, positivas para la tinción. En comparación con el grupo control las células cultivadas en medio ostogénico presentaron una mayor intensidad en la coloración indicativa de un resultado positivo para la fosfatasa alcalina (Figura 12b y d).

El resultado de la tinción de Alizarin Red para evaluar las áreas calcificadas por células aisladas de calvarias a diferencia de las células M3CT3.E1, fueron evidentes. En el grupo control (Figura 13a) se aprecia una ligera tonalidad anaranjada común en la tinción, sin embargo al observarse mediante microscopía de campo claro no se observaron áreas mineralizadas (Figura 13c). Por el contrario, las células cultivadas en medio de diferenciación fueron capaces de llevar a cabo el proceso de mineralización en condiciones *in vitro* (Figura 13 b y d), representado por la aparición de coloración anaranjado-rojizo en grandes áreas de los pozos de cultivo.

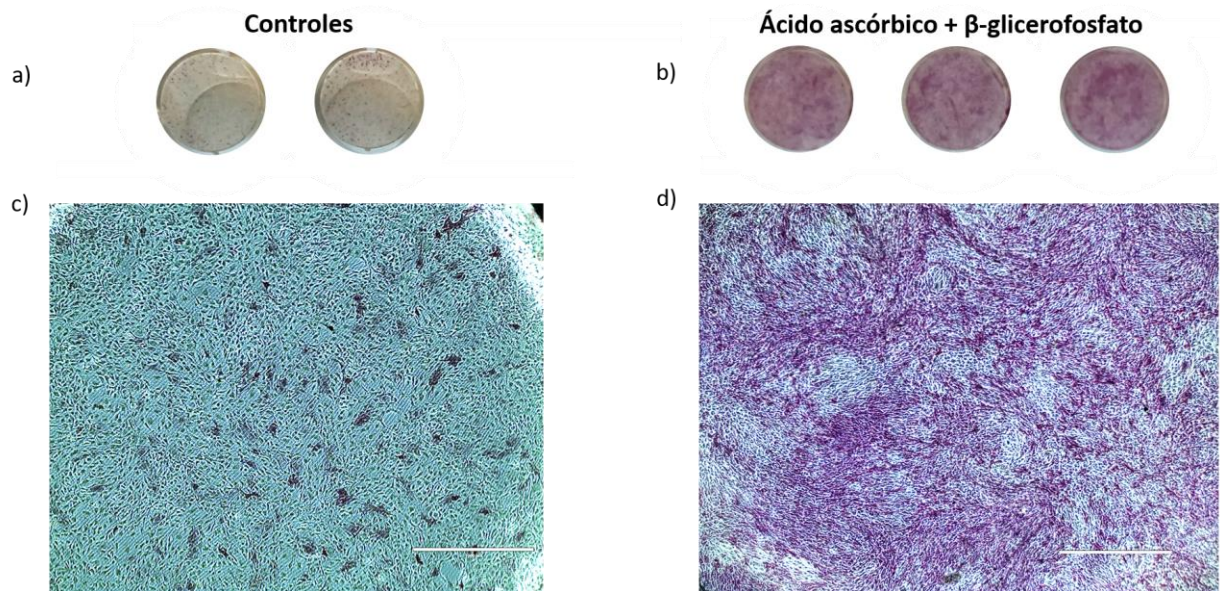


Figura 12. Tinción de Fosfatasa Alcalina en osteoblastos primarios aislados de calvarias de ratón, después de 21 días de cultivo en ausencia (a,c) y presencia (b,d) de ácido ascórbico y β -glicerofosfato. Coloración rosa-morado indica tinción positiva. Barra 100 μ m

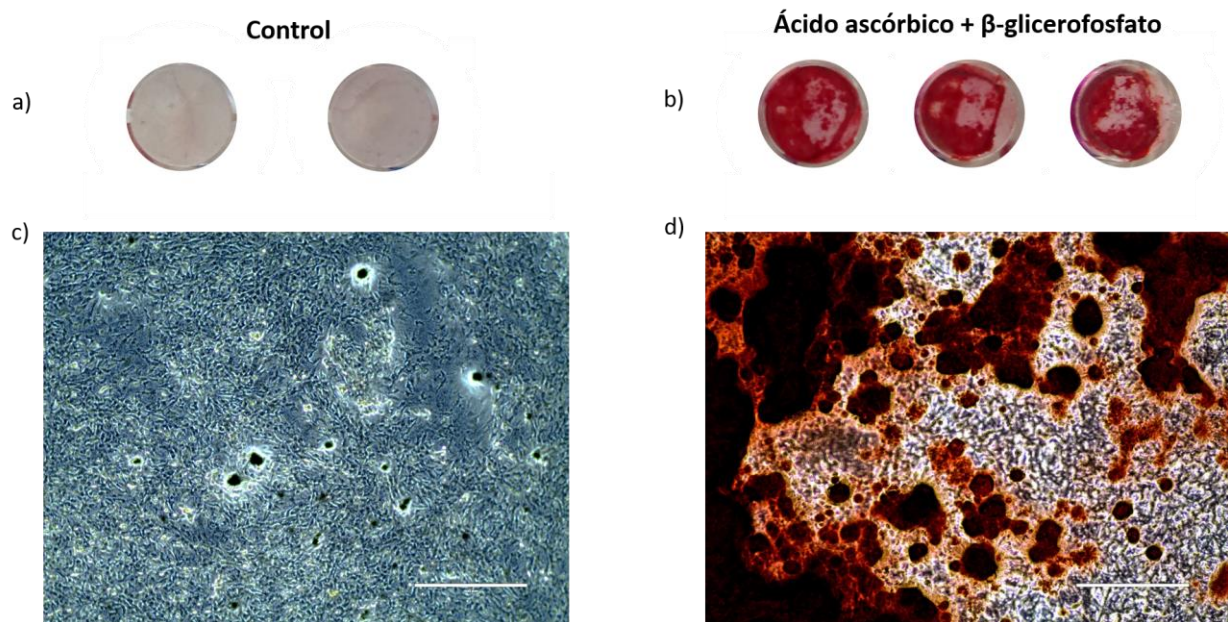


Figura 13. Tinción Alizarin Red en osteoblastos primarios aislados de calvarias de ratón, después de 21 días de cultivo en ausencia (a,c) y presencia (b,d) de ácido ascórbico y β -glicerofosfato. Coloración anaranjado-rojo indica áreas calcificadas. Barra 400 μ m

3.3 Establecimiento de un modelo *in vivo* de osteoporosis

3.3.1 Evaluación de genes en hembras BALB/c de 8 semanas con ovariectomía

3.3.1.1 Extracción, cuantificación e integridad del RNA de húmeros de hembras BALB/c

Para evaluar la expresión relativa de genes asociados a remodelación ósea, las hembras con ovariectomía y controles fueron sacrificadas un mes después de realizado el procedimiento de remoción de ovarios. Los huesos empleados para la extracción del RNA fueron húmeros de hembras BALB/c de 8 semanas con ovariectomía y de hembras control, de acuerdo a la metodología descrita con anterioridad. La concentración y pureza del RNA se analizó mediante espectrofotometría, los resultados se muestran en la Tabla 2. Si bien de todas las muestras se logró extraer más de 100ng/ μ l de RNA total, hubo una gran variación entre la cantidad extraída en las diferentes muestras. La relación de absorbancia 260/280 indicó que el RNA era de pureza aceptable para trabajar con él.

Tabla 2. Cuantificación del RNA proveniente de húmeros de hembras BALB/C de 8 semanas de edad con ovariectomía y grupo control.

Muestra	RNA total (ng/ μ l)	Relación A260/A280
Control I	550.7	2.01
Control II	379.7	2.04
OVX 1	121.0	2.03
OVX 2	265.5	2.07
OVX 3	631.2	1.99
OVX 4	216.4	2.02
OVX 5	318.2	2.04

La integridad del RNA total se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, empleando 500ng de RNA aproximadamente. Sin embargo, no es posible apreciar las bandas correspondientes a los RNA's ribosomales 28s y 18s en ninguna de las muestras (Figura 14). Se realizaron varios ensayos evaluando diferentes condiciones de velocidad y tiempos de homogeneización durante el procesamiento de la muestra sin mejores resultados. Una de las razones por las que el RNA obtenido no está íntegro, es posiblemente debido al método de homogeneización o al de extracción. Sin embargo tomamos la decisión de proceder y realizar la síntesis del DNA complementario utilizando 2.5 μ g de RNA total.

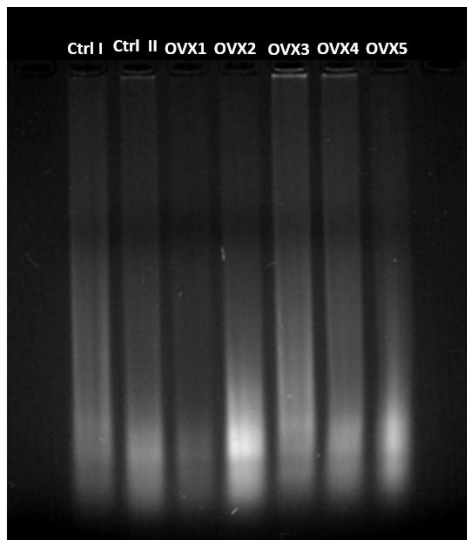


Figura 14. Evaluación de la integridad del RNA total extraído de húmeros de hembras BALB/c de 8 semanas en gel de agarosa al 1%. Ctrl: Control; OVX: ovariectomía.

3.3.1.2 Efecto de la ovariectomía en la expresión de genes asociados a remodelación ósea en hembras BALB/c

Empleando la técnica de PCR en tiempo real, se estimó la expresión relativa de genes asociados a remodelación ósea (RANKL, OPG, RUNX2, ALPL, CTSK, MMP13, TRAP) con respecto al gen constitutivo RPL32. Evaluar la expresión de RANKL y OPG permite determinar si hay una señalización que favorece un aumento desequilibrado de la osteoclastogénesis y por ende un incremento en la pérdida ósea, los resultados mostraron una reducción significativa ($p < 0.001$) en la tasa de transcripción de OPG (Figura 15b) así como en RANKL ($p < 0.01$) (Figura 15a). Mientras que la proporción RANKL/OPG sugiere una tendencia a una mayor expresión de RANKL en proporción a OPG, pero no un aumento significativo (Figura 15c).

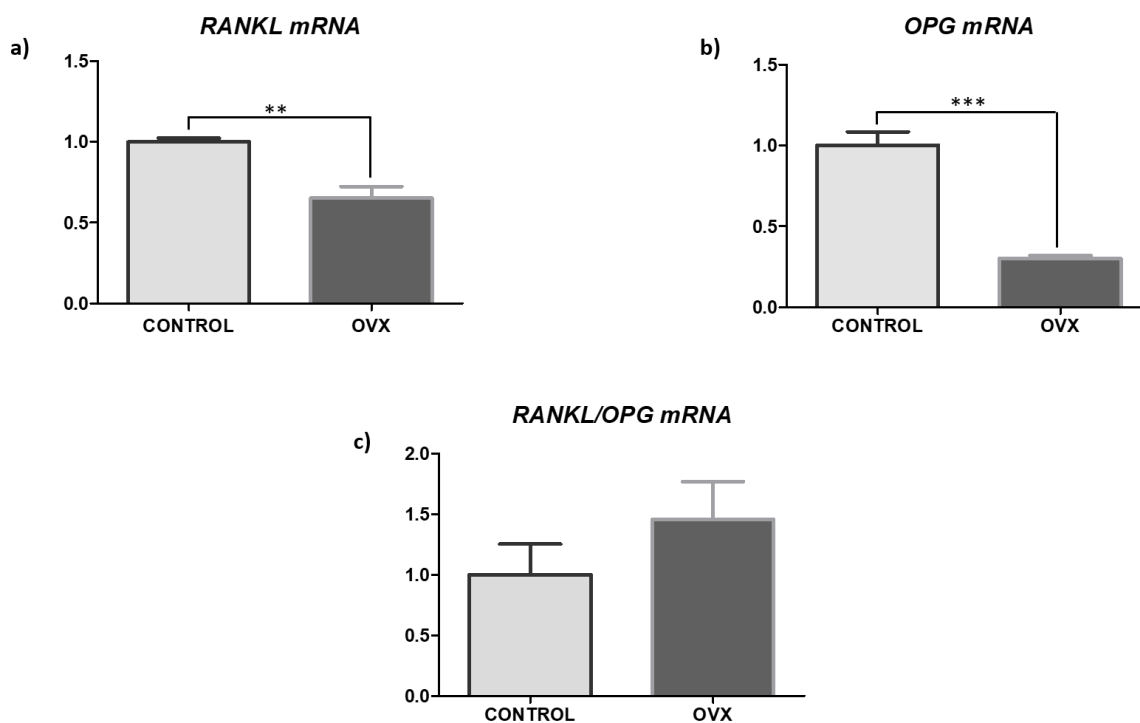


Figura 15. Evaluación de genes indicadores de remodelación ósea. Después de un mes de realizada la ovariectomía se encontró una disminución en la expresión de (a) RANKL y (b) OPG, mientras que en la proporción (c) RANKL/OPG se aprecia una mayor expresión de RANKL, respecto al grupo control. Prueba estadística Mann-Whitney U (Los cambios significativos se muestran con asteriscos ** p < 0.01, *** p < 0.001).

Los niveles de expresión de genes relacionados a la diferenciación y maduración de osteoblastos (RUNX2 y ALPL) fueron menores en el grupo con ovariectomía en comparación con los controles (Figura 16a y 16b), esta reducción es esperada si hay un proceso osteoporótico en el hueso. Sin embargo, los genes osteoclásticos (CTSK y TRAP) también disminuyeron en los ratones con ovariectomía (Figura 16c y e), contrariamente a los resultados esperados. En cuanto a MMP13 no se apreciaron diferencias significativas en su expresión (Figura 16d).

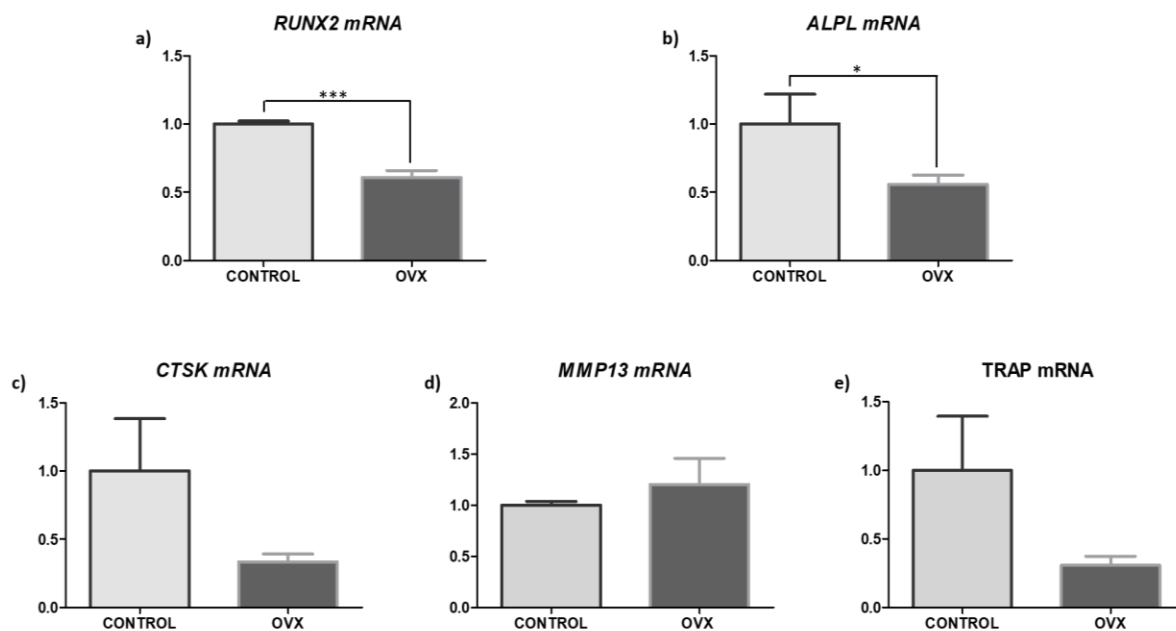


Figura 16. Efectos de ovariectomía sobre la expresión relativa de genes asociados a osteoclastos y osteoblastos. Después de un mes de ovariectomía en hembras BALB/c de 8 semanas la expresión de los genes osteoblásticos (a) RUNX2 y (b) ALPL se vio disminuida. Mientras que no se encontraron cambios significativos en la expresión de genes osteoclastóticos (c) CTSK, (d) MMP13 y (e) TRAP. Prueba estadística Mann-Whitney U. (Los cambios significativos se muestran con asteriscos *p < 0.05, *** p < 0.001)

3.3.2 Evaluación de genes en hembras C57BL/6 de 8 semanas con ovariectomía

3.3.2.1 Extracción, cuantificación e integridad del RNA de húmeros provenientes de hembras C57BL/6 con OVX

En la tabla 3 se muestra la concentración del RNA total obtenido de los húmeros provenientes de hembras C57BL/6 de 8 semanas de edad, tanto del grupo control como del grupo con OVX, nuevamente se aprecia una gran variación en la cantidad de RNA obtenido; de igual forma se presentan las relaciones de absorbancia (A260/280) de cada muestra, indicando una pureza dentro del rango aceptable (1.8-2.1).

Tabla 3. Cuantificación del RNA proveniente de humeros de hembras C57BL/6 de 8 semanas con ovariectomía y grupo control.

Muestra	RNA total (ng/ μ l)	Relación A260/A280
Control I	457.9	2.01
Control II	539.8	1.99
Control III	600.9	1.99
OVX 1	182.3	2.02
OVX 2	211.7	1.97
OVX 3	302.2	1.97
OVX 4	524.1	2.03
OVX 5	313.5	1.99
OVX 6	826.3	2.08

La integridad del RNA se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. En la Figura 17, se muestra el resultado del gel, donde se puede apreciar en algunas muestras tenuemente las bandas posiblemente pertenecientes a los ARN's ribosomales 28s y 18s, sin embargo nuevamente pensamos que el método de lisis del hueso está afectando la calidad del ARN obtenido. Posteriormente se procedió a la síntesis del DNA complementario para consecuentemente evaluar la expresión de genes mediante PCR cuantitativa en tiempo real.

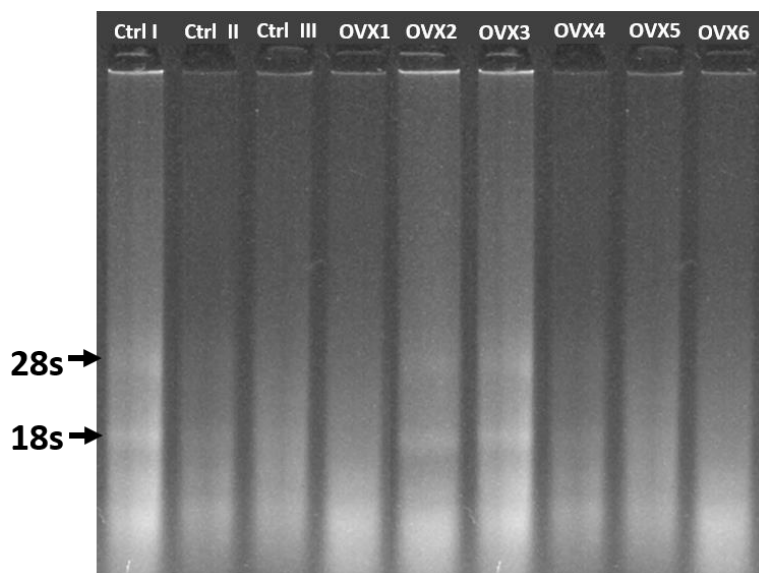


Figura 17. Evaluación de la integridad del RNA total extraído de humeros de hembras C57BL/6 de 8 semanas con ovariectomía y grupo control en gel de agarosa al 1%. Ctrl: Control; OVX: ovariectomía.

3.3.2.2 Efecto de la ovariectomía en la expresión de genes asociados a remodelación ósea en hembras C57BL/6

Mediante el análisis empleando PCR en tiempo real, se evaluó la expresión relativa de genes asociados a remodelación ósea (RANKL, OPG, RUNX2, ALPL, CTSK, MMP13, TRAP) con respecto al gen constitutivo RPL32. Los resultados mostraron una reducción significativa ($p < 0.001$) en la tasa de transcripción de RANKL (Figura 18a). Mientras que en OPG y en la proporción RANKL/OPG no se encontraron modificaciones en su nivel de expresión (Figura 18b y c).

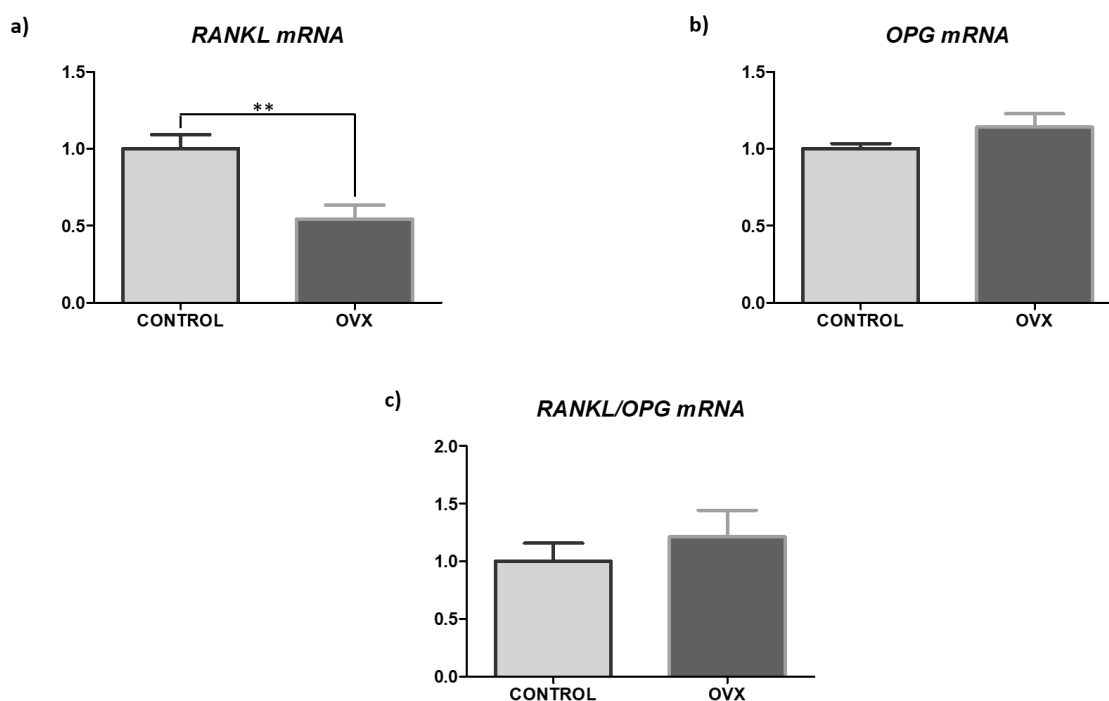


Figura 18. Evaluación de genes indicadores de remodelación ósea. Posterior a la ovariectomía se encontró una disminución en la expresión de (a) RANKL, pero en (b) OPG no se observa un cambio significativo en su expresión ni en en la proporción (c) RANKL/OPG, en los húmeros de hembras C57BL/6 de 8 semanas respecto al grupo control. Prueba estadística Mann-Whitney U (Los cambios significativos se muestran con asteriscos ** $p < 0.01$).

Sin embargo, no se observaron diferencias en la expresión de genes relacionados a la diferenciación (RUNX2) y maduración de osteoblastos (ALPL), y genes osteoclásticos (CTSK, MMP13 y TRAP), entre el grupo control y los ratones con ovariectomía (Figura 19).

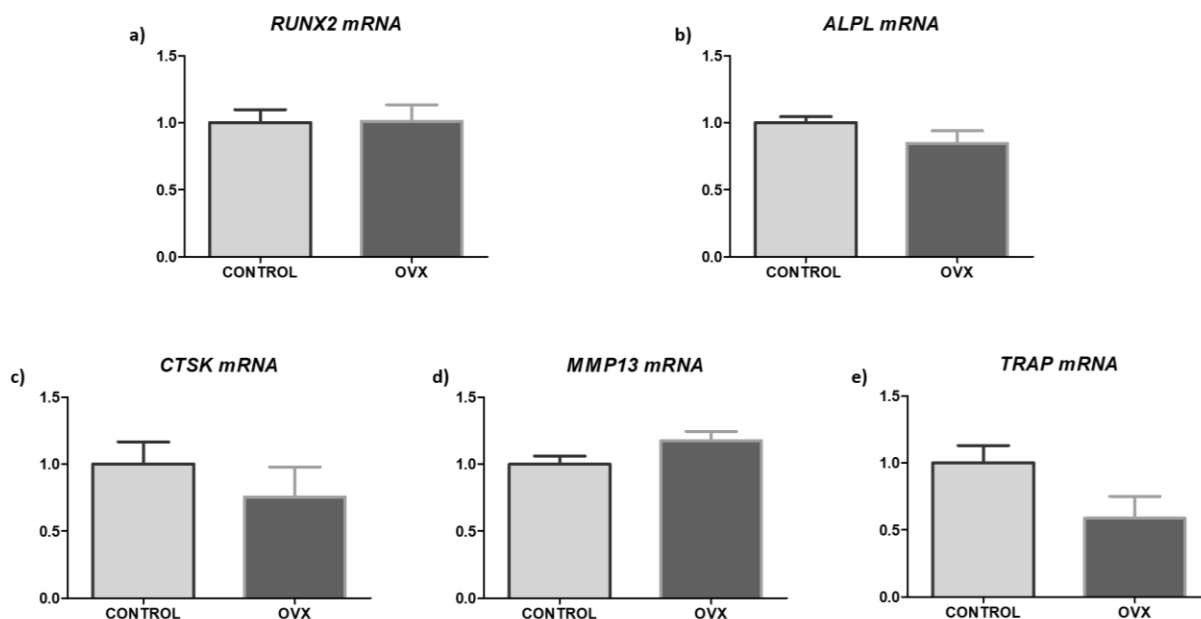


Figura 19. Evaluación de la expresión relativa de genes asociados a osteoclastos y osteoblastos en hembras con OVX. Después de un mes de realizada la ovariectomía no se observaron cambios significativos en la expresión de los genes analizados (a) RUNX2, (b) ALPL, (c) CTSK, (d) MMP13 y (e) TRAP en los húmeros de hembras C57BL/6 de 8 semanas respecto al grupo control. Prueba estadística Mann-Whitney U.

3.3.3 Evaluación de genes en hembras C57BL/6 de 16 semanas con ovariectomía

3.3.3.1 Extracción, cuantificación e integridad del RNA de húmeros provenientes de hembras C57BL/6 de 16 semanas con OVX

Los húmeros tanto del grupo control como el grupo con ovariectomía fueron homogeneizados, para llevar a cabo la extracción del RNA total empleando una combinación del método de extracción con Trizol y un kit comercial. En la Tabla 4 se aprecia la cantidad de RNA obtenida de cada muestra así como la pureza. Posteriormente se evaluó la integridad del RNA mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 20), de manera similar a los experimentos previos no fue posible identificar adecuadamente la presencia de las bandas ribosomales (28s y 18s), por lo tanto no se logró confirmar la integridad mediante esta técnica. Sin embargo se decidió llevar a cabo la síntesis del DNA complementario para posteriormente evaluar la expresión del gen constitutivo RPL32. Al obtener una amplificación aceptable del gen se decidió evaluar la expresión de genes asociados a remodelación ósea.

Tabla 4. Cuantificación del RNA proveniente de húmeros de hembras C57BL/6 de 16 semanas de edad con ovariectomía y grupo control.

Muestra	RNA total (ng/ μ l)	Relación A260/A280
Control I	321.1	1.99
Control II	202.5	1.99
Control III	536.3	1.99
OVX 1	455.1	1.94
OVX 2	131.4	1.90
OVX 3	455.2	1.98
OVX 4	186.2	2.00
OVX 5	837.5	1.98

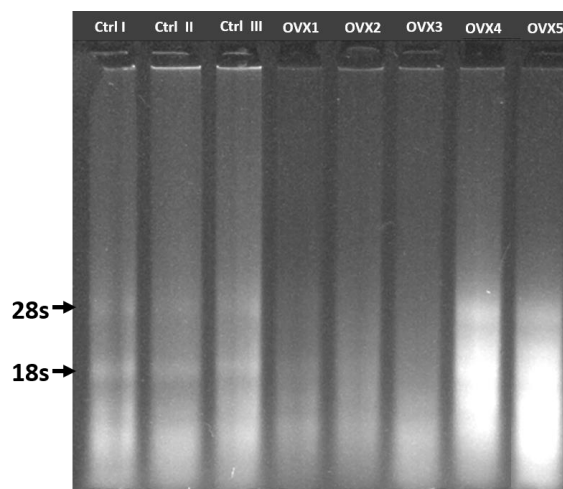


Figura 20. Gel de agarosa que muestra el ARN total extraído de húmeros de hembras C57BL/6 de 16 semanas utilizando Trizol y un kit comercial.

3.3.3.2 Efecto de la ovariectomía en la expresión de genes asociados a remodelación ósea en hembras C57BL/6 de 16 semanas

Se evaluaron los niveles de mRNA de RANKL y OPG en los húmeros de ratones control y OVX al término del experimento. Se encontró que los niveles de mRNA de RANKL eran más bajos respecto al control (Figura 21a), mientras que la expresión de OPG se encontraba incrementada (Figura 21b). Por

tanto la relación RANKL/OPG (Figura 21c) sugirió una tendencia hacia la inhibición de osteoclastogénesis en las muestras evaluadas. Dado que en la osteoporosis siguen presentes los ciclos de osteoblastogénesis se continuó con la evaluación de genes asociados a osteoblastos y osteoclastos para identificar si había genes que pudieran indicar una actividad de osteoclastos aumentada.

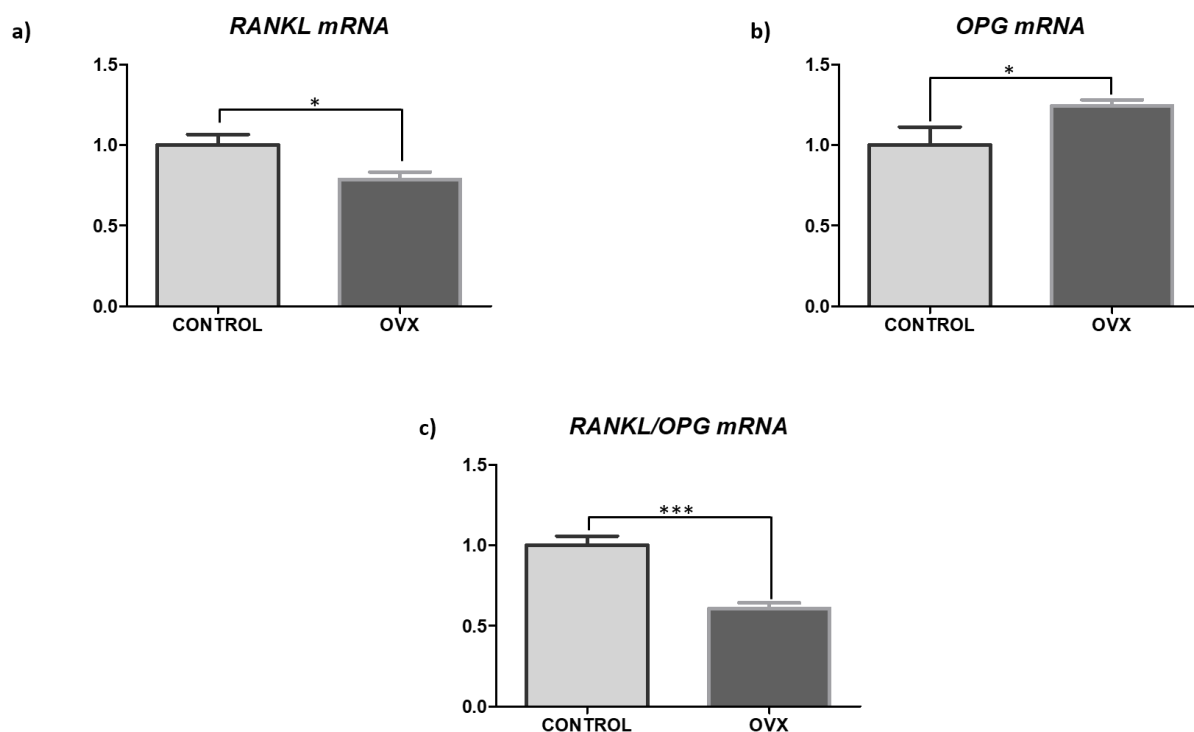


Figura 21. Expresión relativa del mRNA de a) RANKL, b) OPG y c) Proporción RANKL/OPG de húmeros provenientes de hembras C57BL/6 de 16 semanas con OVX y grupo control se evaluó mediante PCR cuantitativa en tiempo real después de 1 mes de la cirugía. Prueba estadística Mann-Whitney U (Los cambios significativos se muestran con asteriscos *p < 0.05, *** p < 0.001).

Para determinar si las hembras con ovariectomía presentaban un incremento en la resorción ósea se decidió evaluar su efecto en genes asociados a osteoblastos (RUNX2, ALPL) y osteoclastos (CTSK, MMP13 y TRAP). Primeramente en los genes osteoblásticos (Figura 22 a y b) presentaban un incremento en la expresión de RUNX2 un regulador maestro de la osteoclastogénesis, mientras que la ALPL se encontraba disminuido. En cuanto a los genes osteoclásticos (Figura 22 c-d) su expresión se encontró disminuida en comparación al grupo control. De forma general pareciera que el tejido analizado se encontraba en un proceso de osteoblastogénesis.

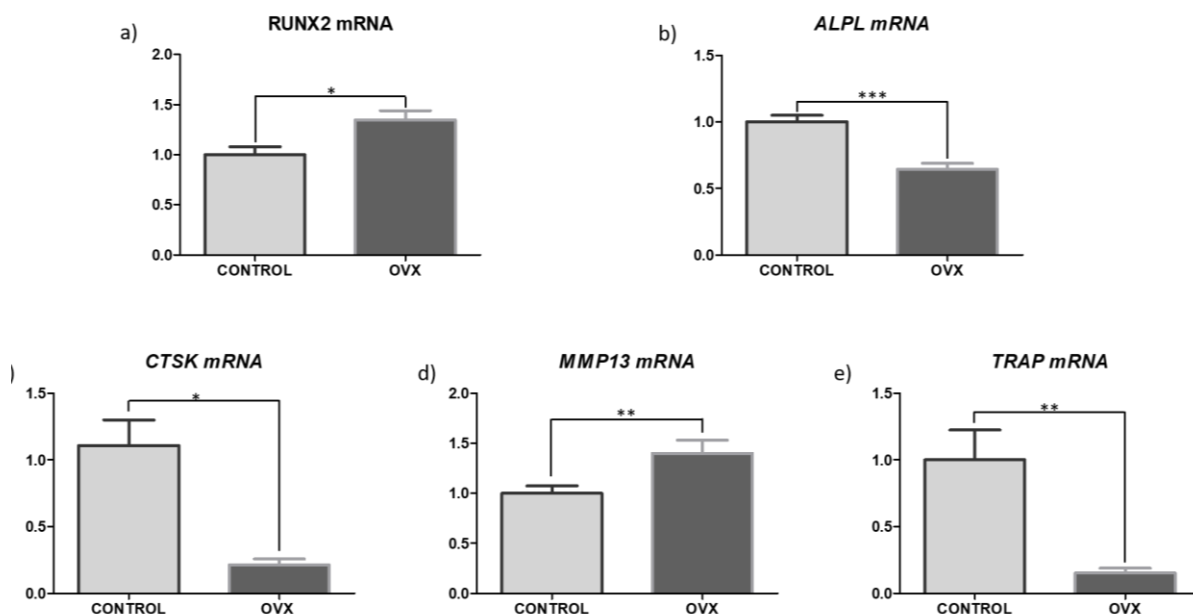


Figura 22. Evaluación de genes asociados a osteoclastos y osteoblastos en hembras C54BL/6 de 16 semanas con OVX. Después de un mes de realizada la ovariectomía se encontraron variaciones en los niveles de expresión de los genes analizados. Prueba estadística Mann-Whitney U (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

3.3.4 Análisis histomorfométrico representativo de hueso

La tinción con hematoxilina por su naturaleza catiónica permite teñir estructuras ácidas (por ejemplo el núcleo de las células) en tonos azules, mientras que la eosina de carácter aniónico da una coloración rosa a componentes básicos (por ejemplo el citoplasma celular). La adición de Orange G a la eosina permite observar el hueso en color anaranjado. La Figura 23a corresponde a un corte histológico del fémur de un ratón del grupo control de BABL/c, por ende, se aprecia la arquitectura normal de un hueso sano; mientras que en la Figura 23b correspondiente al fémur de una ratón BALB/c y 23c perteneciente al fémur de un ratón C57BL/6 de 8 semanas, ambos con ovariectomía; es posible observar disminución en el área del hueso trabecular.

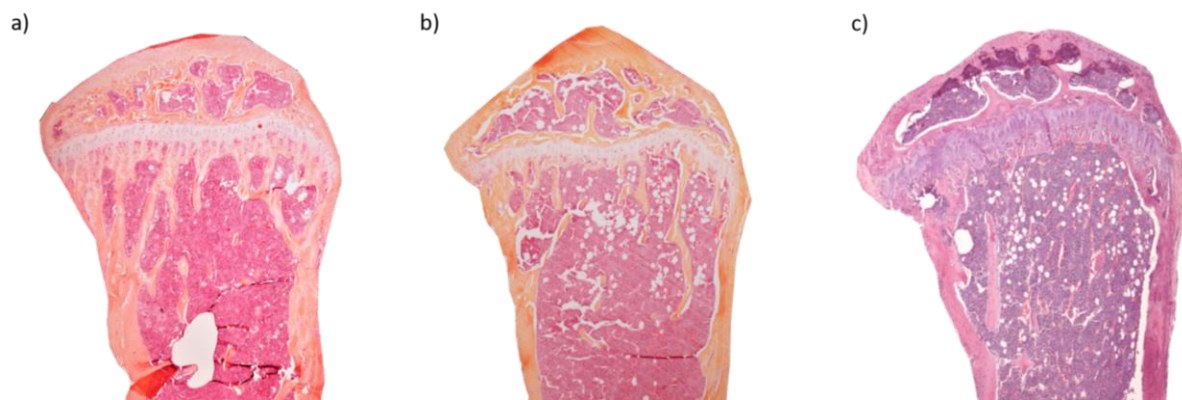


Figura 23. Histología representativa. Cortes histológicos de fémur teñidos con hematoxilina y eosina-orange g, correspondientes a: a) ratón BALB/c grupo control, b) ratón BALB/c con ovariectomía, y c) ratón C57BL/6 de 8 semanas con ovariectomía. Se aprecia la disminución de hueso trabecular en los ratones con ovariectomía. Amplificación 4x.

Capítulo 4. Discusión

El esqueleto humano cumple con una gran diversidad de funciones en nuestro organismo, entre las que se encuentran: el proveer integridad mecánica para la locomoción, proteger órganos vitales, participar en las vías metabólicas asociadas con la homeostasis mineral y el equilibrio ácido-base, servir como un reservorio de factores de crecimiento y citocinas, y suministrar el medio para la hematopoyesis. En el año 2012, Karsenty y Ferron postularon la hipótesis de que el esqueleto es una entidad endocrina capaz de afectar a otros órganos como páncreas, riñones y sistema nervioso, ha cobrado fuerza.

Dada la importancia del sistema óseo para mantener la homeostasis de nuestro organismo ha sido necesario el desarrollo de modelos de estudio que nos permitan comprender su biología, estudiar las enfermedades que lo afectan, evaluar compuestos con potencial terapéutico o mejorar los tratamientos existentes. Dentro de los modelos de estudios actuales podemos encontrar: modelos *in vitro* de osteoclasto y osteoblastogénesis a partir de líneas celulares; modelos *ex vivo*: como el cultivo de células primarias o de explantes de huesos (calvarias, cabeza de fémur o hueso de mandíbula fraccionado); y modelos *in vivo* de osteoporosis, inducida mediante ovariectomía o tratamiento con 4-vinilciclohexeno diepóxido. Dado que en nuestro laboratorio estamos interesado en entender los mecanismos de la remodelación ósea ya sea en condiciones de salud o enfermedad así como evaluar compuestos con posible efecto terapéutico, en este trabajo se planteó la implementación de este tipo de modelos para poder estudiar la remodelación ósea.

4.1 Establecimiento de un modelo *in vitro* de osteoclastogénesis

Las células RAW264.7 corresponden a células de estirpe monocito/macrófago que han sido transformadas con el virus de la leucemia murina de Abelson, y que poseen el potencial de ser diferenciadas a osteoclastos al ser cultivadas en presencia del ligando del receptor nuclear κ B (RANKL). Algunas de las ventajas que un modelo de este tipo ofrece, incluyen: disponibilidad de una gran cantidad de células para trabajar, células fáciles de cultivar, cultivo homogéneo, y obtención de una gran cantidad de osteoclastos activos capaces de llevar a cabo resorción de la matriz ósea (Collin y Osdoby, 2012). Sin embargo en nuestros resultados encontramos lo contrario. Las células crecen muy lentamente y tardamos varios meses en obtener un cultivo homogéneo que creciera estable a buena velocidad. Una vez que se obtuvo un cultivo estable la diferenciación de las células fue exitosa independientemente de la densidad

celular sembrada. Pese a que no fue posible contar los osteoclastos por problemas de contratación, se apreciaban células grandes y multinucleadas.

Sin embargo, en cultivos posteriores fue imposible obtener nuevo osteoclastos partiendo de células RAW264.7. Dado que la densidad de células por pozo puede afectar el desarrollo de osteoclastos (una densidad muy baja o alta), se sembraron nuevamente a 5×10^3 y 1×10^4 células/200 μ l, remarcando que anteriormente en ambas densidades se observaron osteoclastos. También se emplearon dos concentraciones de RANKL 25 y 50ng/ml, sin que llegar a observar el proceso de osteoclastogénesis en ninguna de las condiciones. Los resultados obtenidos en los posteriores esfuerzos por diferenciar las células RAW264.7 a osteoclastos puede deberse a que si bien este modelo ha sido ampliamente utilizado por otros laboratorios, a menudo se discute en la literatura o en paneles de discusión científica (por ejemplo *Research Gate*), la pérdida en estas células de su capacidad de diferenciación durante los pases consecutivos. De acuerdo a un estudio publicado por Taciak (2018) las células RAW264.7 no deberían emplearse para diferenciación después del pase número 20, y conforme a la American Type Culture Collection (ATCC), la recomendación es emplear estas células hasta antes del pase 18 (Collin y Osdoby, 2012). En cuanto a las células empleadas en este trabajo no se tiene la información correcta del número de pase en el que se encontraban cuando se comenzó a trabajar con ellas, siendo una posibilidad el que hayan perdido su capacidad de diferenciación, dado todas las condiciones de cultivo que se probaron sin llegar a obtener osteoclastos nuevamente.

4.2 Establecimiento de un modelo *ex vivo* de osteoclastogénesis

La médula ósea alberga una gran diversidad de células, entre ellas células con el potencial de diferenciación a osteoclastos en presencia de dos citocinas esenciales, el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y del ligando del receptor nuclear κ B (RANKL). Dada la importancia de los osteoclastos como células encargadas de llevar a cabo la resorción ósea y su marcada participación en enfermedades como la osteoporosis, su cultivo ha sido un modelo clave para el estudio del metabolismo óseo. En este trabajo, basándonos en diversos protocolos reportados, se establecieron las condiciones apropiadas para lograr la obtención de osteoclastos en nuestro laboratorio, empleando concentraciones distintas de RANKL. La obtención de osteoclastos depende en gran medida de: 1) la densidad de células sembradas, es decir cantidades subóptimas pueden no llegar a generar la cantidad de osteoclastos deseados; 2) la concentración de M-CSF o de RANKL, las concentraciones elevadas de M-CSF pueden

inhibir la diferenciación de células precursoras en osteoclastos (Hodge et al., 2007). Mientras que concentraciones bajas de RANKL pueden retrasar la formación de osteoclastos y que las cantidades obtenidas sean menores a las esperadas (Collin y Osdoby, 2012). Bajo nuestras condiciones se aprecian osteoclastos después de 2-3 días de cultivo alcanzando la mayor cantidad de células entre los días 9-10. Las condiciones de diferenciación que incluyen M-CSF y RANKL, ambos a 50ng/ml, son las que consideramos más viables dado que se obtiene un número suficiente de osteoclastos y facilitan el conteo o caracterización de las células. Este modelo permite cultivar, diferenciar y estudiar los osteoclastos a partir de un cultivo *ex vivo* de médula ósea. Sin embargo, es importante remarcar que si el mecanismo de estudio o compuesto evaluado es mediado por osteoblastos, no podría observarse un efecto a menos que se emplee un co-cultivo de osteoblastos y osteoclastos. También es de importancia enriquecer el modelo con ensayos de resorción de matriz mineralizada, para evaluar la actividad de los osteoclastos que son obtenidos mediante en el protocolo establecido.

4.3 Establecimiento de un modelo *in vitro* de osteoblastogénesis

Sudo y colaboradores en 1983, publicaron el potencial de la línea celular MC3T3.E1 correspondiente a preosteoblastos aislados de calvarias de ratón neonatos, para diferenciarse en osteoblastos y formar tejido óseo calcificado *in vitro*. A lo largo de la historia, se han aislado una serie de subclonas de esta línea celular con y sin potencial ostogénico, de acuerdo a la *American Type Culture Collection* las subclonas 4 (ATCC CRL-2593) y 14 (ATCC CRL-2594) muestran altos niveles de diferenciación y formación de matriz extracelular mineralizada después de 10 días de cultivo en presencia de ácido ascórbico y fosfato inorgánico (β -glicerofosfato), mientras que las subclonas 24 (ATCC CRL-2595) y 30 (ATCC CRL-2596) tienen una pobre diferenciación a osteoblastos y no forman matriz mineralizada. Por otra parte, se ha reportado la posible pérdida de la capacidad de formación ósea después del pase 30 en las subclonas que se diferencian a osteoblastos (Yan *et al.*, 2013). En los ensayos realizados en el presente trabajo con la línea celular MC3T3.E1 después de 21 días de cultivo en medio suplementado con ácido ascórbico y β -glicerofosfato se encontró un incremento en la actividad de la fosfatasa alcalina (AP) pero no mineralización. Previamente se ha reportado que la actividad de la ALP no es suficiente para determinar la capacidad de formación ósea de las células MC3T3.E1 (Yan *et al.*, 2013), por ello no es de extrañar el encontrar un incremento en su actividad después de su estimulación. En cuanto a la mineralización se encontró que cultivar las células con poca o nula capacidad de diferenciación en concentraciones igual o mayor a 2mM de β -glicerofosfato puede inducir mineralización distrófica o mineralización no apatítica

(Langenbach y Handschel, 2013). Por lo anterior y de acuerdo a los resultados obtenidos posiblemente las células con que se trabajó corresponden a una de las subclonas que no forman matriz mineralizada o que son células que han perdido su potencial ostogénico, por tanto no fue posible obtener osteoblastogénesis *in vitro*.

4.4 Establecimiento de un modelo *ex vivo* de osteoblastogénesis

Para el cultivo *ex vivo* de osteoblastos, puede inducirse la diferenciación de sus precursores presentes en médula ósea (células mesenquimales), o del aislamiento de sus precursores o de osteoblastos maduros de huesos fraccionados y digeridos en colagenasa, entre otras metodologías. Un buen modelo de osteoblastogénesis debe comprender las tres etapas del desarrollo de los osteoblastos; proliferación, maduración de la matriz extracelular y mineralización. En este trabajo se establecieron y estandarizaron varios protocolos para estudiar la biología del hueso a partir de protocolos previamente publicados, como son aquellos que establecen las condiciones para aislar células de calvarias de ratón neonato (Bakker y Klein, 2012; Jonason y O'Keefe, 2014), así como su posterior maduración y/o diferenciación a osteoblastos. Tras 21 días de cultivo de las células aisladas y cultivadas en presencia de ácido ascórbico y β -glicerofosfato se logró apreciar un incremento en la actividad de la fosfatasa alcalina indicador de la actividad y diferenciación de osteoblastos, así como la identificación de depósitos de calcio (mineralización) en la matriz secretada por las células. Logrando obtener osteoblastos activos, capaces de llevar a cabo mineralización en condiciones *ex vivo*, y que permiten evaluar compuestos con potencial en regeneración ósea. Para complementar este modelo es necesario realizar ensayos que permitan evaluar la actividad de la enzima fosfatasa alcalina no solo de forma cualitativa sino cuantitativa, así como análisis de la cantidad de área mineralizada ya sea mediante mediciones con algún software como ImageJ o cuantificación de Alizarin Red mediante absorbancia. Dichas técnicas aunadas a las realizadas en este trabajo arrojarán datos más representativos de los resultados que puedan llegar a obtenerse al emplear el modelo.

4.5 Establecimiento de un modelo *in vivo* de osteoporosis mediante ovariectomía

Después de la menopausia, la disminución en los niveles de estrógeno es uno de los factores que puede inducir un desequilibrio entre la formación y resorción ósea, favoreciendo el desarrollo de

osteoporosis postmenopáusicas. Si bien, los ratones no sufren un proceso similar a la menopausia, la disminución de estrógenos resultante del proceso de ovariectomía (OVX) promueve la diferenciación de osteoclastos, su actividad, e incrementa su tiempo de vida. No obstante de que la OVX puede inducir un incremento en la actividad osteoblástica, no es suficiente para evitar la pérdida ósea (Manolagas, 2010). A pesar, de que el modelo de OVX en roedores ha sido un procedimiento criticado por interrumpir la función ovárica de manera abrupta (a diferencia de la disminución gradual que ocurre en las mujeres), resulta en pérdida de hueso tanto cortical como trabecular, de forma similar a los patrones de la osteoporosis en humanos, mientras que en la osteoporosis inducida tras la administración de busferelina o VCD, los cambios óseos logrados son de menor magnitud (Sophocleous e Idris, 2014).

En nuestros resultados, se esperaba un incremento en los genes osteoclásticos TRAP, MMP13, CTSK y RANKL, y una disminución en los genes osteoblásticos RUNX2, ALPL y OPG, en las muestras correspondientes a ratones con ovariectomía. Sin embargo, el análisis de genes en ratones C57BL/6 de 8 y 16 semanas con OVX no reflejó los cambios esperados, en los ratones de 8 semanas pareciera que no hubo efecto del procedimiento, y en 16 semanas aparenta un proceso de osteoblastogénesis. Por otro lado, la disminución en los niveles del mRNA de OPG, RUNX2 y ALPL se observó después de OVX, en humeros de los ratones BALB/c de 8 semanas, son los únicos cambios que son similares a lo deseado. De acuerdo a nuestra experiencia en modelos de metástasis óseas es posible encontrar después de un mes, cambios marcados en la expresión de genes asociados lesiones osteolíticas o pérdida ósea en humeros, sin embargo en los modelos de osteoporosis este patrón no ocurre, al analizar los humeros de ratones un mes después de OVX, no fue posible encontrar un cambio indicativo de remodelación ósea incrementada. Estos resultados pueden deberse a que, no todos los sitios de hueso trabecular exhiben la misma tasa de pérdida ósea ni todos los sitios pierden hueso a la misma velocidad. Se ha detectado que la pérdida ósea inducida por ovariectomía no se presenta en el hueso trabecular de las epífisis de huesos largos, la metáfisis tibial distal y la vértebra caudal (Jee y Yao, 2001; Bouxsein *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2018), mientras que el húmero es un tejido poco empleado para el análisis de genes, y cuando se ha llegado a emplear se analiza hasta después de dos meses de realizada la cirugía (Chiellini *et al.*, 2008).

En contraste con el análisis de genes, pudimos observar en los cortes histológicos que la OVX estimuló resorción ósea en ratones BALB/c y C57BL/6 de 8 semanas, evidenciado por una disminución de hueso trabecular en el área proximal de la tibia derecha. También, la efectividad del procedimiento de OVX fue confirmada por la atrofia en el tejido de los úteros en hembras C57BL/6 de 16 semanas de edad.

En resumen, se logró establecer el modelo de ovariectomía en ratones, determinamos que el análisis genético en húmeros no es representativo de osteoporosis después de un mes de OVX, sin embargo, en la histología y en el tejido de úteros si encontramos efecto debido a la disminución de estrógenos. Es posible que se necesiten estudios de mayor duración para detectar cambios en la expresión de genes en el húmero de los ratones con OVX. Se recomienda trabajar con grupos de estudio mayores ampliando la “n” lo que posiblemente permitirá detectar diferencias más representativas. Es indispensable realizar la histología en nuestro laboratorio, para no depender de terceros y evitar nuevamente pérdida de tejidos. Finalmente se requiere complementar los estudios donde se emplee este modelo con análisis de Nano-tomografía computarizada (nCT), para obtener mediciones histomorfométricas. Incorporar marcadores bioquímicos de recambio óseo (por ejemplo fosfatasa alcalina ósea, propéptido carboxiterminal del procolágeno tipo I, fosfatasa ácida tartrato resistente), así como evaluar número y tamaño de células femorales TRAP positivas en ratones control y con ovariectomía.

Capítulo 5. Conclusiones

La osteoporosis es una enfermedad frecuente en México y en la población mundial que se caracteriza por afectar la densidad del hueso, haciéndolos frágiles e incrementando el riesgo a fracturas que afectan la calidad de vida de tanto hombres como mujeres en edad avanzada. Para poder contribuir al estudio de los mecanismos de la enfermedad y la validación de nuevos agentes terapéuticos, en este trabajo desarrollamos el establecimiento de diferentes modelos murinos para evaluar la remodelación ósea.

Estos modelos incluyeron modelos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. La estandarización de los modelos *in vitro* mostró que en las condiciones utilizadas, la mejor manera de diferenciar las células a osteoclastos es a partir de células de la médula ósea. Mientras que las células RAW264.7 y MC3T3.E1 no se diferenciaron a osteoclastos u osteoblastos respectivamente posiblemente porque las células habían perdido su capacidad de diferenciación. La utilización de células de médula ósea de ratón, para osteoclastogénesis en el modelo *ex vivo* permitió obtener osteoclastos en 9 días utilizando medio complementado con factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y RANKL. De la misma forma, la complementación de ácido ascórbico y β -glicerofosfato al medio de cultivo de células aisladas de calvarias de ratón durante 21 días permitió la obtención de osteoblastos. Finalmente, los ratones hembras a las que se les realizó ovariectomía para la evaluación de la osteoporosis *in vivo*, presentaron señales de osteoporosis tales como la atrofia del útero y la disminución de hueso trabecular. Además se identificó que el húmero no es el tejido idóneo para realizar el análisis de genes que regulan la remodelación ósea, ya que posiblemente en éste hueso la remodelación ósea sea más lenta comparado con la remodelación de las piernas. Son necesarios estudios posteriores para resolver éste tipo de preguntas.

Los modelos que se estandarizaron en el presente trabajo fueron reproducibles, y nos permitirán en un futuro realizar experimentos para conocer más sobre los mecanismos de la remodelación ósea y la evaluación de nuevos compuestos terapéuticos para el tratamiento de la osteoporosis y otras enfermedades que afecten al sistema óseo.

Literatura citada

- An, J., Leeuwenburgh, S., Wolke, J., y Jansen, J. (2016). Mineralization processes in hard tissue: Bone. En Aparicio, C., y Ginebra, M. (Eds.), *Biom mineralization and Biomaterials*. Woodhead Publishing, España. pp. 129-146.
- Andrade, K., Fornetti, J., Zhao, L., Miller, S. C., Randall, R. L., Anderson, N., y Welm, A. L. (2017). RON kinase: A target for treatment of cancer-induced bone destruction and osteoporosis. *Science translational medicine*, 9(374). doi: 10.1126/scitranslmed.aai9338
- Bakker, A. D., y Klein-Nulend, J. (2012). Osteoblast isolation from murine calvaria and long bones. En Helfrich, M., y Ralston, S., *Bone Research Protocols*. Humana Press, New Jersey. pp. 19-29.
- Boskey, A.L. y Robey, P.G., (2013). The composition of bone. En Rosen, C. J., *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism* (8va Ed.). Wiley & Sons, Washington, DC. pp. 49-58.
- Bouxsein, M. L., Myers, K. S., Shultz, K. L., Donahue, L. R., Rosen, C. J., y Beamer, W. G. (2005). Ovariectomy-induced bone loss varies among inbred strains of mice. *Journal of Bone and Mineral Research*, 20(7), 1085-1092. doi: 10.1359/JBMR.050307
- Cawthray, J., Wasan, E., y Wasan, K. (2017). Bone-seeking agents for the treatment of bone disorders. *Drug Delivery and Translational Research*, 7(4):466-481. doi: 10.1007/s13346-017-0394-3
- Chiellini, C., Cochet, O., Negroni, L., Samson, M., Poggi, M., Ailhaud, G., y Amri, E. Z. (2008). Characterization of human mesenchymal stem cell secretome at early steps of adipocyte and osteoblast differentiation. *BMC molecular biology*, 9(1), 26. doi: 10.1186/1471-2199-9-26
- Clark, R. K. (2005). *Anatomy and Physiology: Understanding the Human Body*. Jones and Bartlett Publisher. USA, pp.474
- Collin-Osdoby, P., y Osdoby, P. (2012). RANKL-mediated osteoclast formation from murine RAW 264.7 cells. In *Bone Research Protocols* (pp. 187-202). Humana Press, Totowa, NJ.
- Collin-Osdoby, P., Yu, X., Zheng, H., y Osdoby, P. (2003). RANKL-mediated osteoclast formation from murine RAW 264.7 cells. En Helfrich, M., y Ralston, S., *Bone Research Protocols*. Humana Press, New Jersey. pp. 153-166.
- Crane, J. L., y Cao, X. (2014). Bone marrow mesenchymal stem cells and TGF- β signaling in bone remodeling. *The Journal of clinical investigation*, 124(2), 466-72. doi: 10.1172/JCI70050.
- Dawson, H. B. (2013). Calcium and Vitamin D. En Rosen, C. J., *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism* (8va Ed.). Wiley & Sons, Washington, DC. pp.403-407.
- Drake, M. T., y Khosla, S. (2013). Role of Sex Steroids in the Pathogenesis of Osteoporosis. En Rosen, C. J., *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism* (8va Ed.). Wiley & Sons, Washington, DC. pp.367-375.
- Ducy, P., Amling, M., Takeda, S., Priemel, M., Schilling, F., y Beil, T. (2000). Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell press*, 21;100(2):197-207. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81558-5

- Esen, E., Chen, J., Karner, C. M., Okunade, A. L., Patterson, B. W., y Long, F. (2013). WNT-LRP5 signaling induces Warburg effect through mTORC2 activation during osteoblast differentiation. *Cell metabolism*, 17(5), 745-755. doi: 10.1016/j.cmet.2013.03.017
- Flaws, J. A., Doerr, J. K., Sipes, I. G., y Hoyer, P. B. (1994). Destruction of preantral follicles in adult rats by 4-vinyl-1-cyclohexene diepoxide. *Reproductive toxicology*, 8(6), 509-514.
- Goulding, A., y Gold, E. (1989). A new way to induce oestrogen-deficiency osteopaenia in the rat: comparison of the effects of surgical ovariectomy and administration of the LHRH agonist buserelin on bone resorption and composition. *Journal of endocrinology*, 121(2), 293-298.
- Harsløf, T., y Langdahl, B. L. (2016). New horizons in osteoporosis therapies. *Current opinion in pharmacology*, 28, 38-42. doi: 10.1016/j.coph.2016.02.012
- Harvey, N., Dennison, E., y Cooper, C. (2009). Epidemiology of osteoporotic fractures. En Rosen, C. J., *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism* (8va Ed.). Wiley & Sons, Washington, DC. pp.198-203.
- Hodge, J. M., Kirkland, M. A., y Nicholson, G. C. (2007). Multiple roles of M-CSF in human osteoclastogenesis. *Journal of cellular biochemistry*, 102(3), 759-768. doi: 10.1002/jcb.21331
- International Osteoporosis Foundation (IOF). (2015). Osteoporosis, facts and statistics. Recuperado el 18 de julio de 2017, de: <https://www.iofbonehealth.org/facts-statistics>
- Jee, W. S., y Yao, W. (2001). Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*, 1(3), 193-207.
- Jonason, J. H., y O'Keefe, R. J. (2014). Isolation and culture of neonatal mouse calvarial osteoblasts. *Methods of molecular biology*, 1130:295-305. doi: 10.1007/978-1-62703-989-5_22.
- Kan, L. (2013). Animal Models of Bone Diseases-A. En Conn, P. M., *Animal Models for the Study of Human Disease*. Academic Press, San Diego, CA. pp. 353-390.
- Karsenty, G., y Ferron, M. (2012). The contribution of bone to whole-organism physiology. *Nature*, 481(7381), 314. doi: 10.1038/nature10763.
- Kleerekoper, M. (2013). Osteoporosis overview. En Rosen, C. J., *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism* (8va Ed.). Wiley & Sons, Washington, DC. pp. 343-347.
- Klibanski, A., Adams-Campbell, L., Bassford, T., Blair, S. N., Boden, S. D., Dickersin, K., y Johnson, S. R. (2001). Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *Journal of the American Medical Association*, 285(6), 785-795. doi:10.1001/jama.285.6.785
- Komarova, S. V., Dixon, S., y Sims, S. M. (2001). Osteoclast Ion Channels Potential Targets for Antiresorptive Drugs. *Current pharmaceutical design*, 7(8), 637-654. doi: 10.2174/1381612013397799
- Langenbach, F., y Handschel, J. (2013). Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. *Stem cell research & therapy*, 4(5), 117.
- Lerner, U. H., (2012). Osteoblasts, Osteoclasts, and Osteocytes: Unveiling Their Intimate-Associated Responses to Applied Orthodontic Forces. *Seminars in Orthodontics*, Vol 18(4), 237-248. doi: 10.1053/j.sodo.2012.06.002

- Manolagas, S. C. (2010). From estrogen-centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. *Endocrine reviews*, 31(3), 266-300. doi: 10.1210/er.2009-0024
- Marie, P. J., y Cohen-Solal, M. (2017). The expanding life and functions of osteogenic cells: From simple bone making cells to multifunctional cells and beyond. *Journal of Bone and Mineral Research*, 33(2):199-210. doi: 10.1002/jbmr.3356
- Marino, S., Logan, J.G., Mellis, D., y Capulli, M.(2014). Generation and culture of osteoclasts. *BoneKEY reports*, 3: 570. doi: 10.1038/bonekey.2014.65
- McClung, M. R., (2013). Denosumab. En Rosen, C. J., *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism* (8va Ed.). Wiley & Sons, Washington, DC. pp. 420-427.
- Michael, H., Härkönen, P. L., Väänänen, H. K., y Hentunen, T. A. (2005). Estrogen and testosterone use different cellular pathways to inhibit osteoclastogenesis and bone resorption. *Journal of Bone and Mineral Research*, 20(12), 2224-2232. doi: 10.1359/JBMR.050803
- Morgan, E.F., Barnes, G.L., y Einhorn, T.A., (2008). The bone organ system: form and fuction. En Marcus, R., Feldman, D., *Osteoporosis* (3er. Ed.). Academic Press, San Diego, CA. pp. 3-25.
- Peck, W. A., Birge, S. J., y Fedak, S. A. (1964). Bone cells: biochemical and biological studies after enzymatic isolation. *Science*, 146(3650), 1476-1477.
- Pederson, L., Ruan, M., Westendorf, J. J., Khosla, S., y Oursler, M. J. (2008). Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(52), 20764-20769. doi: 10.1073/pnas.0805133106
- Pierre, J., y Martine, C. (2017). The expanding life and functions of osteogenic cells: From simple bone making cells to multifunctional cells and beyond. *Journal of Bone and Mineral Research*. 33: 199-210. doi: 10.1002/jbmr.3356
- Raggatt, L. J., y Partridge, N. C. (2010). Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *Journal of Biological Chemistry*, 285(33), 25103-25108. doi: 10.1074/jbc.R109.041087
- Raisz, L. G. (2005). Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *Journal of Clinical Investigation*, 115(12), 3318. doi: 10.1172/JCI27071
- Reid, I. R. (2013). Overview of pathogenesis. En Rosen, C. J., *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism* (8va Ed.). Wiley & Sons, Washington, DC. pp. 357-360.
- Rivadeneira, F., y Mäkitie, O. (2016). Osteoporosis and bone mass disorders: from gene pathways to treatments. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 27(5), 262-281. doi: 10.1016/j.tem.2016.03.006.
- Sophocleous, A., e Idris, A. I. (2014). Rodent models of osteoporosis. *BoneKEY reports*, 3:614. doi: 10.1038/bonekey.2014.109
- Sözen, T., Özişik, L., y Başaran, N. Ç. (2017). An overview and management of osteoporosis. *European journal of rheumatology*, 4(1), 46. doi: 10.5152/eurjrheum.2016.048

- Stern, A. R., Stern, M. M., Van Dyke, M. E., Jähn, K., Prideaux, M., y Bonewald, L. F. (2012). Isolation and culture of primary osteocytes from the long bones of skeletally mature and aged mice. *Biotechniques*, 52(6), 361.
- Sudo, H., Kodama, H. A., Amagai, Y., Yamamoto, S., y Kasai, S. (1983). In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *The Journal of cell biology*, 96(1), 191-198.
- Taciak, B., Białasek, M., Braniewska, A., Sas, Z., Sawicka, P., Kiraga, Ł., Rygiel, T., y Król, M. (2018). Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages. *PLoS one*, 13(6). doi: 10.1371/journal.pone.0198943.
- Takahashi, N., Akatsu, T., Udagawa, N., Sasaki, T., Yamaguchi, A., Moseley, J. M., y Suda, T. (1988). Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology*, 123(5), 2600-2602.
- US Department of Health and Human Services (HHS), (2004). Bone health and osteoporosis: a report of the Surgeon General. Rockville, MD: US Department of Health and Human Services, Office of the Surgeon General, 87.
- Vincent, C., Kogawa, M., Findlay, D. M., y Atkins, G. J. (2009). The generation of osteoclasts from RAW 264.7 precursors in defined, serum-free conditions. *Journal of bone and mineral metabolism*, 27(1), 114-119. doi: 10.1007/s00774-008-0018-6
- Wan, Q., Schoenmaker, T., JanseN, I., Bian, Z., de Vries, T. J., y Everts V., (2016). Osteoblasts of calvaria induce higher numbers of osteoclasts than osteoblasts from long bone. *Bone*, 86, 10-21. doi: 10.1016/j.bone.2016.02.010
- Weinstein, R. S., y Manolagas, S. C. (2000). Apoptosis and osteoporosis. *The American journal of medicine*, 108(2), 153-164. doi: 10.1016/S0002-9343(99)00420-9
- Wright, L. E., Christian, P. J., Rivera, Z., Van Alstine, W. G., L Funk, J., L Boussein, M., y Hoyer, P. B. (2008). Comparison of skeletal effects of ovariectomy versus chemically induced ovarian failure in mice. *Journal of Bone and Mineral Research*, 23(8), 1296-1303. doi: 10.1359/jbmr.080309.
- Yan, X. Z., Yang, W., Yang, F., Kersten-Niessen, M., Jansen, J. A., y Both, S. K. (2013). Effects of continuous passaging on mineralization of MC3T3-E1 cells with improved osteogenic culture protocol. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 20(3), 198-204. doi: 10.1089/ten.tec.2012.0412
- Zhao, C., Irie, N., Takada, Y., Shimoda, K., Miyamoto, T., Nishiwaki, T., y Matsuo, K. (2006). Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Cell metabolism*, 4(2), 111-121. doi: 10.1016/j.cmet.2006.05.012
- Zhou, S., Wang, G., Qiao, L., Ge, Q., Chen, D., Xu, Z., y Jiang, Q. (2018). Age-dependent variations of cancellous bone in response to ovariectomy in C57BL/6J mice. *Experimental and therapeutic medicine*, 15(4), 3623-3632. doi: 10.3892/etm.2018.5839.