

**DEPARTAMENTO DE ENFERMERÍA
E. U. CIENCIAS DE LA SALUD**

INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS FEDERICO OLÓRIZ



TESIS DOCTORAL

***EFFECTOS DE DISTINTAS BIOMOLÉCULAS DE
UTILIDAD CLÍNICA SOBRE CULTIVOS
PRIMARIOS DE OSTEÓBLASTOS HUMANOS***

OLGA GARCÍA MARTÍNEZ
UNIVERSIDAD DE GRANADA, 2007

La memoria de Tesis Doctoral que lleva por título: EFECTOS DE DISTINTAS BIOMOLÉCULAS DE UTILIDAD CLÍNICA SOBRE CULTIVOS PRIMARIOS DE OSTEÓBLASTOS HUMANOS, ha sido presentada por la Licenciada OLGA GARCÍA MARTÍNEZ para aspirar al grado de Doctor, bajo la dirección de Dña. CONCEPCIÓN RUIZ RODRÍGUEZ y la codirección de D. MANUEL FRANCISCO VALLECILLO CAPILLA y Dña. CANDELA REYES BOTELLA.

Fdo.: Olga García Martínez

Dra. CONCEPCIÓN RUIZ RODRIGUEZ, Catedrática de E. U. del Departamento de Enfermería de la Escuela Universitaria de Ciencias de la Salud de la Universidad de Granada.

CERTIFICA:

Que OLGA GARCÍA MARTÍNEZ, Licenciada en Odontología, ha realizado bajo mi dirección y tutela el trabajo de Tesis Doctoral, sobre el tema: EFECTOS DE DISTINTAS BIOMOLÉCULAS DE UTILIDAD CLÍNICA SOBRE CULTIVOS PRIMARIOS DE OSTEÓBLASTOS HUMANOS, y cuenta con mi aprobación para ser presentada, a fin de obtener el Grado de Doctor.

Fdo.: Dra. Concepción Ruiz Rodríguez

Dr. MANUEL FRANCISCO VALLECILLO CAPILLA, Profesor Titular del Departamento de Estomatología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Granada.

CERTIFICA:

Que OLGA GARCÍA MARTÍNEZ, Licenciada en Odontología, ha realizado bajo mi codirección el trabajo de Tesis Doctoral, sobre el tema: EFECTOS DE DISTINTAS BIOMOLÉCULAS DE UTILIDAD CLÍNICA SOBRE CULTIVOS PRIMARIOS DE OSTEÓBLASTOS HUMANOS, y cuenta con mi aprobación para ser presentada, a fin de obtener el Grado de Doctor.

Fdo.: Dr. Manuel Francisco Vallecillo Capilla

Dra. CANDELA REYES BOTELLA, Profesora Asociada del Departamento de Estomatología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Granada.

CERTIFICA:

Que OLGA GARCÍA MARTÍNEZ, Licenciada en Odontología, ha realizado bajo mi codirección el trabajo de Tesis Doctoral, sobre el tema: EFECTOS DE DISTINTAS BIOMOLÉCULAS DE UTILIDAD CLÍNICA SOBRE CULTIVOS PRIMARIOS DE OSTEÓBLASTOS HUMANOS, y cuenta con mi aprobación para ser presentada, a fin de obtener el Grado de Doctor.

Fdo.: Dra. Candela Reyes Botella

Parte de los resultados recogidos en la presente Tesis Doctoral han dado lugar a las siguientes aportaciones científicas:

Artículos

García-Martínez O, Reyes-Botella C, Aguilera-Castillo O, Vallecillo-Capilla MF, Ruiz C (2006) Antigenic profile of osteoblasts present in human bone tissue sections. *Biosci Rep* 26(1): 39-43.

García-Martínez O, Reyes-Botella C, Vallecillo Capilla MF, Ruiz C. Effect of platelet-rich plasma on primary cultured human osteoblast-like cells. En prensa

Comunicaciones Nacionales e Internacionales

García-Martínez O., Pérez Fernández E., Ruiz Rodríguez C., Vallecillo Capilla M.F., Reyes-Botella C.

Título: Osteoblastos: modulación de la proliferación y ciclo celular.

Tipo de participación: Comunicación en formato póster.

Congreso: II Encuentros Hispano-Cubanos de Ciencias de la Salud. Departamento de Enfermería. Universidad de Granada.

Lugar celebración: Granada

Fecha: 25/04/2003 hasta 26/04/2003

García-Martínez O.

Título: Efecto del plasma rico en plaquetas sobre la proliferación y ciclo celular de osteoblastos humanos en cultivo.

Tipo de participación: Comunicación oral galardonada con el PRIMER PREMIO.

Congreso: X Congreso ANEO-EDSA y IX Congreso Jóvenes Dentistas.

Lugar celebración: Sevilla

Fecha: 16-06-2003

Reyes-Botella C., García-Martínez O., Pérez E., Vallecillo Capilla M.F., Ruiz C.

Título: Expresión antigénica de los osteoblastos humanos en cortes de tejido.

Tipo de participación: Comunicación formato póster.

Congreso: II Congreso Nacional de la Sociedad Española de Cirugía Bucal.

Publicación: Acta del congreso.

Lugar celebración: Valencia

Fecha: 22/10/2003 hasta 25/10/2003

Díaz Rodríguez L., García-Martínez O., Arroyo Morales M, Ruiz Rodríguez C.

Título: Efecto de los AINES sobre la proliferación osteoblástica.

Tipo de participación: Comunicación formato póster.

Congreso: II Jornadas de Ciencias de la Salud. Escuela Universitaria de Ciencias de la Salud. Universidad de Granada.

Lugar celebración: Granada

Fecha: 04/03/2005 hasta 05/03/2005

García-Martínez O., Mazzaglia G., Reyes-Botella C., Vallecillo-Capilla M.F., Ruiz C.

Título: Effect of PRP on antigenic phenotype of osteoblast-like cells.

Tipo de participación: Comunicación formato póster

Congreso: IADR

Lugar celebración: Ámsterdam (Holanda)

Fecha: 14-17 de septiembre de 2005

García-Martínez O., Díaz Rodríguez L., Ruiz C., Reyes-Botella., Mazzaglia G.

Título: Efecto del Paracetamol sobre la proliferación ósea.

Tipo de participación: Comunicación formato póster.

Congreso: III Jornadas Nacionales y I Internacionales de Ciencias de la Salud.

Lugar celebración: Granada

Fecha: 11-13 de mayo de 2006

García-Martínez O., Díaz Rodríguez L., Ruiz C., Reyes-Botella., Pérez E.

Título: Papel modulador del Ibuprofeno sobre distintos parámetros fisiológicos de osteoblastos humanos en cultivo.

Tipo de participación: Comunicación formato póster.

Congreso: III Jornadas Nacionales y I Internacionales de Ciencias de la Salud.

Lugar celebración: Granada

Fecha: 11-13 de mayo de 2006

García-Martínez O., Muñoz R, Díaz Rodríguez L., Ruiz C.

Título: Effect of Ibuprofen on bone proliferation.

Tipo de participación: Comunicación formato póster.

Congreso: EUROPERIO 5.

Lugar celebración: Madrid

Fecha: 29 de junio – 1 julio de 2006

Mazzaglia G., García-Martínez O., Días L., Mazzaglia R., Ruiz C.

Título: Effect of acetaminophen on different physiological parameters of human osteoblasts.

Tipo de participación: Comunicación formato póster.

Congreso: IADR

Lugar celebración: Dublín

Fecha: 13-16 de Septiembre de 2006

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. TEJIDO ÓSEO	2
1.1. Formación de tejido óseo	3
1.2. Resorción ósea.....	4
1.3. Reparación ósea.....	4
2. OSTEÓBLASTOS	6
2.1. Origen (ontogenia)	6
2.2. Diferenciación	7
2.3. Identificación.....	8
2.3.1. Identificación morfológica	8
2.3.2. Identificación bioquímica.....	9
2.3.3. Identificación antigénica	13
2.3.4. Identificación genética	16
2.4. Papel funcional del osteoblasto	17
3. FACTORES DE CRECIMIENTO Y CITOQUINAS.....	20
3.1. Factores de crecimiento.....	21
3.1.1. TGF β (Transforming Growth Factor- β).....	21
3.1.2. FGF (Fibroblastic Growth Factor)	22
3.1.3. BMPs (Bone Morphogenetics Proteins).....	22
3.1.4. EGF (Epidermal Growth Factor).....	23
3.1.5. IGF-I y II (Insulin-like Growth Factor I y II).....	23
3.1.6. PDGF (Platelet-Derived Growth Factor)	24
3.1.7. VEGF (Vascular Endotelial Growth Factor).....	24
3.1.8. GM-CSF (Granulocyte/macrophage-Colony Stimulating Factor).....	25
3.1.9. M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor)	25
3.2. Citoquinas.....	25
4. PLASMA RICO EN PLAQUETAS.....	28
5. INFLAMACIÓN	33
5.1. Fármacos antiinflamatorios	34
5.1.1. AntiInflamatorios No Esteroideos (AINE)	34
5.1.2. Antiinflamatorios Esteroideos (corticosteroides).....	40
5.2. Antiinflamatorios y osteoblastos	44
5.3. Antiinflamatorios en odontología.....	45
II. OBJETIVOS	50

III. MATERIAL Y MÉTODOS	52
1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES ANTIGÉNICOS EN CÉLULAS FRESCAS	53
1.1. Muestras de tejido	53
1.2. Anticuerpos monoclonales	53
1.3. Inmunohistoquímica	54
2. ESTUDIO DEL EFECTO DEL PRP SOBRE DIFERENTES MARCADORES CELULARES	56
2.1. Obtención de tejido óseo	56
2.2. Obtención del Plasma Rico en Plaquetas	56
2.3. Aislamiento y cultivo de osteoblastos	57
2.4. Preparación de las células osteoblásticas para su estudio	58
2.4.1. Estudio del efecto del PRP sobre la proliferación celular	58
2.4.2. Estudio del efecto del PRP sobre la expresión antigénica	59
2.4.3. Estudio del efecto del PRP sobre el ciclo celular	60
3. EFECTO DE LOS ANTIINFLAMATORIOS COMÚNMENTE UTILIZADOS EN EL TRATAMIENTO ODONTOLÓGICO SOBRE DISTINTOS PARÁMETROS CELULARES	61
3.1. Efecto de los antiinflamatorios sobre la proliferación celular	61
3.2. Efecto de los antiinflamatorios sobre el perfil antigénico	62
3.3. Efecto de los antiinflamatorios sobre el ciclo celular	63
3.4. Efecto de los antiinflamatorios sobre la capacidad fagocítica	63
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	65
IV. RESULTADOS.....	66
1. EXPRESIÓN DE MARCADORES ANTIGÉNICOS EN CÉLULAS FRESCAS.....	67
2. EFECTO DEL PRP SOBRE DIFERENTES MARCADORES CELULARES ..	68
2.1. Aislamiento, cultivo y caracterización de los osteoblastos humanos.....	68
2.2. Efecto del PRP sobre la proliferación celular	68
2.3. Efecto del PRP sobre la expresión antigénica	70
2.3.1. Expresión de los antígenos CD10 y CD13.....	70
2.3.2. Expresión del antígeno CD44	71
2.3.3. Expresión del antígeno CD54	71
2.3.4. Expresión del antígeno CD69	72
2.3.5. Expresión del antígeno CD80 y CD86.....	72
2.3.6. Expresión de HLA-DR.....	73
2.3.7. Expresión del Fosfatasa Alcalina	74
2.4. Efecto del PRP sobre el ciclo celular	74

3. EFECTO DE LOS ANTIINFLAMATORIOS COMÚNMENTE UTILIZADOS EN EL TRATAMIENTO ODONTOLÓGICO SOBRE DISTINTOS PARÁMETROS CELULARES	76
3.1. Efecto de los antiinflamatorios sobre la proliferación celular.....	76
3.1.1. Efecto del Ibuprofeno sobre la proliferación de osteoblastos humanos	76
3.1.2. Efecto del Paracetamol sobre la proliferación de osteoblastos humanos	77
3.1.3. Efecto de la Metilprednisolona sobre la proliferación de osteoblastos humanos	79
3.2. Modulación del perfil antigénico de los osteoblastos humanos en cultivo por la acción de diferentes antiinflamatorios	80
3.2.1. Efecto del tratamiento con Ibuprofeno sobre la expresión antigénica	81
3.2.2. Efecto del tratamiento con Paracetamol sobre la expresión antigénica	86
3.2.3. Efecto del tratamiento con Metilprednisolona sobre la expresión antigénica	91
3.3. Efecto de los antiinflamatorios sobre el ciclo celular.....	96
3.3.1. Efecto del tratamiento con Ibuprofeno sobre el ciclo celular.....	96
3.3.2. Efecto del tratamiento con Paracetamol sobre el ciclo celular.....	96
3.3.3. Efecto del tratamiento con Metilprednisolona sobre el ciclo celular	97
3.4. Efecto de los antiinflamatorios sobre la capacidad fagocítica de osteoblastos humanos en cultivo frente a partículas de látex.....	98
3.4.1. Efecto del tratamiento con Ibuprofeno sobre la capacidad fagocítica de osteoblastos humanos en cultivo	98
3.4.2. Efecto del tratamiento con Paracetamol sobre la capacidad fagocítica de osteoblastos humanos en cultivo	99
3.4.3. Efecto del tratamiento con Metilprednisolona sobre la capacidad fagocítica de osteoblastos humanos en cultivo	100
V. DISCUSIÓN	102
1. EXPRESIÓN DE MARCADORES ANTIGÉNICOS DE LOS OSTEÓBLASTOS PRESENTES EN CORTES DE TEJIDO ÓSEO	103
2. EFECTO DEL PRP SOBRE DIFERENTES PARÁMETROS CELULARES Y MOLECULARES DE OSTEÓBLASTOS HUMANOS EN CULTIVO	107
3. EFECTO DEL IBUPROFENO, PARACETAMOL Y METILPREDNISOLONA SOBRE DISTINTOS PARÁMETROS CELULARES Y MOLECULARES DE OSTEÓBLASTOS HUMANOS EN CULTIVO	115
VI. CONCLUSIONES.....	122
VII. BIBLIOGRAFÍA	124

I. INTRODUCCIÓN

1. TEJIDO ÓSEO

El tejido óseo es un tejido altamente complejo, formado por un componente celular y una matriz orgánica calcificada (constituida por fibras y por una sustancia fundamental impregnada en sales de calcio).

Los tres tipos celulares del tejido óseo son:

- Los osteoblastos, células responsables de la formación de tejido.
- Los osteocitos, células principales del tejido adulto.
- Los osteoclastos, células responsables de la resorción del tejido óseo.

Existe en el tejido óseo un “pool” de células madre formado por una serie de células mesenquimatosas indiferenciadas. Estas células se multiplican por mitosis, diferenciándose unas en osteoblastos (que se convertirán después en osteocitos) y las otras en osteoclastos (Poirier, 1985).

La matriz ósea, donde se ubican las células, consta de una matriz orgánica impregnada en sales minerales, la cual está formada en un 90% de colágeno, principalmente de tipo I, y en un 10% por proteínas no colagénicas. La mayoría de éstas son proteínas fosforiladas, como la osteonectina; proteínas que contienen ácido γ -carboxiglutámico como la osteocalcina; sialoproteínas como la osteopontina; proteoglicanos y proteínas séricas. La función y distribución de estas proteínas no es del todo conocida pero se cree que participan activamente en la mineralización de la matriz (Aubin, Liu, Malaval, & Gupta, 1995).

Las sales minerales presentes en el tejido óseo son principalmente carbonato y fosfato cálcico, que se encuentran en forma de fosfato cálcico amorfo y de cristales de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$).

Los elementos constituyentes del tejido óseo se organizan de diversas formas. Existen dos grandes tipos fundamentales de organización de estos elementos:

El tejido óseo laminar, “secundario”, “adulto” o “definitivo”: es el tipo que se encuentra normalmente en el adulto y va siempre precedido de un tejido óseo no laminar al que sustituye progresivamente.

El tejido óseo no laminar, “primitivo” o “inmaduro”, de fibras entrecruzadas: es el tipo que aparece inicialmente y que será sustituido por tejido óseo laminar. En circunstancias especiales como reparación de fracturas, tumores, etc., la formación acelerada de tejido óseo en el adulto origina la forma no laminar (Poirier, 1985).

1.1. Formación del tejido óseo

En los adultos humanos, la formación ósea ocurre generalmente por remodelación. Los eventos implicados en la formación y remodelación ósea incluyen: el cese de la actividad osteoclástica y la desaparición de los osteoclastos del lugar de resorción; atracción de los precursores de osteoblastos a dicho lugar; proliferación de los precursores de osteoblastos; diferenciación de estos precursores a osteoblastos maduros con capacidad de secretar colágeno; formación de matriz mineralizada y cese de la actividad osteoblástica (Pfeilschifter & Mundy, 1987)

Al final de la secuencia de formación, cuando no se requiere más síntesis de matriz ósea, los osteoblastos pierden su capacidad sintética y quedan como osteoblastos inactivos, células de la línea de formación ósea o bien resultan atrapados en el frente de calcificación, incluyéndose en el hueso como osteocitos.

Los osteocitos son las células encargadas de mantener la integridad estructural de la matriz mineralizada. Intervienen además en la liberación o depósito cálcico para el mantenimiento de la homeostasis del calcio en el cuerpo. Esta actividad en la regulación del calcio es controlada directamente por la concentración de éste en el plasma e indirectamente por las hormonas paratiro-hormona (PTH) y calcitonina.

Algunos estudios sugieren que los osteoblastos se ven sometidos a procesos de muerte celular o apoptosis en los lugares de remodelación. Hay numerosos signos en los lugares de resorción que son consecuencia de la inhibición de la actividad osteoclástica,

como el aumento de los niveles de calcio (Zaidi, 1990) y de fosfato (Yates, Oreffo, Mayor, & Mundy, 1991).

De la misma forma, hay muchos mecanismos implicados en la atracción de precursores de osteoblastos a los lugares de resorción, como son algunos constituyentes de la matriz ósea entre los que se citan fragmentos de colágeno, osteocalcina o factores de crecimiento (Mundy et al., 1995).

1.2. Resorción ósea

La resorción ósea es dependiente de la actividad del osteoclasto. Los agentes promotores de ésta producen su efecto incrementando la formación de osteoclastos y activando los ya existentes. Actualmente se considera que en este proceso están implicados junto a los factores hormonales, distintos tipos celulares.

1.3. Reparación ósea

La reparación ósea tiene lugar tras un trauma y generalmente ocurre en dos fases; una reparación inicial y una segunda remodelación. Tras el trauma, son liberados distintos mediadores desde el tejido, así como desde los componentes celulares de la sangre. Granulocitos, monocitos y linfocitos migran a la herida acompañados de células mesenquimales pluripotenciales. Estas células producen en el lugar del trauma un exudado con citoquinas y mediadores de la inflamación que reclutan más células inflamatorias y factores de crecimiento. Dependiendo del estímulo, las células migran, proliferan y se diferencian en células endoteliales, fibroblastos, condroblastos y osteoblastos, los cuales producirán vasos y un nuevo tejido conectivo local que reemplazará al coágulo que se origina como consecuencia de la hemorragia que produce el trauma. Las células con propiedades fagocíticas como los macrófagos digerirán los restos de tejido. Después los condroblastos y osteoblastos formarán el callo óseo (LaStayo, Winters, & Hardy, 2003).

Por tanto, junto a factores vasculares y mecánicos, en la osteogénesis y modelado óseo intervienen hormonas, factores de crecimiento, citoquinas y proteínas osteoinductoras (Mott, Mailhot, Cuenin, Sharawy, & Borke, 2002).

Si bien clásicamente se ha considerado a las hormonas sistémicas, y en particular a la somatotropa y a las hormonas calcitotrópicas (paratohormona, calcitonina, calcitriol), como las mayores responsables del crecimiento y remodelado óseo, cada vez hay más evidencias que atribuyen un papel importante a los factores de crecimiento (David Roodman, 2003). Estos polipéptidos con capacidad mitogénica, serían producidos por las propias células esqueléticas o por tejidos extraesqueléticos. En el primer caso actuarían como factores autocrinos o paracrinos sobre las propias células que los originaron, o sobre las inmediatas a ellas, y en el segundo serían transportados por la sangre hasta el hueso (Takigawa, Nakanishi, Kubota, & Nishida, 2003). Así, el balance entre resorción y la formación ósea es regulado, entre otros, por una serie de citoquinas que incluyen el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), interleuquina 1 (IL-1), interleuquina 4 (IL-4), interleuquina 6 (IL-6), interleuquina 11 (IL-11), prostaglandina E₂ (PGE₂), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y factor transformador de crecimiento β (TGF- β), que son sintetizados por células estromales de la médula ósea y por los osteoblastos, y que actúan modulando la actividad y diferenciación de los osteoblastos (Jilka, 1998).

Por tanto, el remodelado del hueso es un fenómeno complejo. El mantenimiento de una masa y morfología ósea determinadas es consecuencia de su continua, ordenada y equilibrada resorción y formación. Estos procesos, a su vez, están determinados por factores genéticos, vasculares, mecánicos, sistémicos y locales.

2. OSTEOLASTOS

El tejido óseo está formado por una serie de células, entre las que se encuentran los osteoblastos, que son la población celular objeto de nuestro estudio. El término osteoblasto describe una línea de células que cambia considerablemente sus propiedades en los diferentes estadios de desarrollo o diferenciación. Frecuentemente, se usa para describir a las células responsables de la síntesis y secreción de matriz ósea, o componente orgánico de la matriz extracelular del nuevo hueso, también conocida como matriz y osteoide. No obstante, el linaje osteoblástico también incluye al preosteoblasto, al osteocito y la célula *lining* ósea también llamada osteocito de superficie, osteoblasto inactivo, célula lineal endóstica o célula mesenquimal plana.

2.1. Origen (ontogenia)

Los osteoblastos se originan a partir de células mesenquimales primitivas pluripotenciales, que dan lugar a una progenie con capacidad de diferenciación más limitada, incluso monopotencial. Los mediadores que inducen estos pasos, son todavía desconocidos, aunque está demostrado que los glucocorticoides, la superfamilia TGF- β y la proteína morfogenética de hueso (BMP) desempeñan una función reguladora en estadios de diferenciación tempranos de algunas líneas celulares (Aubin et al., 1995).

Algunos investigadores mantienen la hipótesis de que, a partir de un único precursor derivado de células mesenquimales, se originan los osteoblastos, los adipocitos y las células hematopoyéticas secundarias en la médula ósea; cada una de estas líneas se distingue en base a su morfología y función. En los últimos años este precursor se ha identificado como células Westen-Baiton, células progenitoras mesenquimales y células fibroblásticas estromales de la médula (Bianco & Boyde, 1993) (Caplan, 1994; Gundle, Joyner, & Triffitt, 1995; Gimble, Robinson, Wu, & Kelly, 1996) (Wada, Inagawa-Ogashiwa, Shimizu, Yasumoto, & Hashimoto, 2002).

La existencia de un progenitor pluripotencial hace que haya una estrecha relación entre los adipocitos y los osteoblastos. En este sentido, los mecanismos que regulan la formación de adipocitos en el estroma pueden favorecer la osteogénesis y la hematopoyesis. De hecho éstas células expresan fenotipo osteoblástico, como actividad

fosfatasa alcalina, síntesis de osteocalcina, osteopontina o colágeno tipo IV, expresión de CD44, VCAM y de citoquinas, etc. (Gimble et al., 1996; Noth et al., 2002).

Asimismo, entre las líneas celulares de osteoblastos y condroblastos también existe una relación muy estrecha. Aún no se ha podido demostrar que exista un progenitor bipotencial para células formadoras de hueso y cartílago aunque se han aislado clones derivados de tibia de embrión de pollo que expresan bipotencialidad para hueso y cartílago (Hall et al., 2001).

En esta línea, parece apropiado considerar, además de un progenitor bipotencial, la posibilidad de la transdiferenciación o un cambio fenotípico directo de unas células a otras. Esta hipótesis está reforzada por el hecho de que los condrocitos no mueren sino que pueden transdiferenciarse en osteoblastos e incluso pueden expresar fenotipo osteoblástico, como la expresión de matriz mineralizada o la expresión de marcadores de superficie (Aubin et al., 1995).

2.2. Diferenciación

La diferenciación consiste en el proceso de especialización de la estructura y la función celular que tienen carácter progresivo, y al parecer irreversible.

Según las etapas de proliferación celular, al comienzo de la formación de nódulos, la secuencia de desarrollo osteoblástico comprende tres fases: proliferación, síntesis de matriz y maduración, y mineralización (Liu, Malaval, Gupta, & Aubin, 1994; Malaval, Modrowski, Gupta, & Aubin, 1994).

Basándonos en estudios morfológicos e histológicos, las células osteoblásticas se dividen en una secuencia lineal desde osteoprogenitores a preosteoblastos, osteoblastos y osteocitos. Los osteoblastos son identificados por su morfología, su localización en el hueso y por su capacidad de sintetizar matriz mineralizada, además de tener propiedades como la síntesis de colágeno tipo I (COLL-I), osteopontina (OPN), osteonectina, sialoproteína ósea (BSP), osteocalcina (OCN) y actividad fosfatasa alcalina (ALP); así como la respuesta a hormonas y a los factores de crecimiento. Los cambios en la expresión de estas moléculas están relacionados con los distintos grados de desarrollo y

maduración de los osteoblastos; así, en estudios *in vitro*, se ha comprobado que la síntesis de colágeno tipo I disminuye con la maduración, la actividad fosfatasa alcalina decrece con la mineralización, la osteopontina aparece antes que otras proteínas como la sialoproteína y la osteocalcina, etc. En este sentido existe información que muestra que marcadores como la actividad fosfatasa, la síntesis colagénica y no colagénica y la respuesta a hormonas, entre otros, refleja la existencia de células relativamente maduras. Las etapas de diferenciación o maduración de cada una de las moléculas mencionadas se expresa en relación al desarrollo de otros marcadores como la adquisición de la forma cuboidal, que permiten reconocer los distintos estadios de diferenciación de los osteoblastos maduros. Existen otros indicadores de la maduración de los osteoblastos, así por ejemplo, la presencia de ácido ascórbico y β -glicerofosfato provoca en estas células cambios estructurales en la formación de nódulos, tanto a nivel histológico ultraestructural como inmunohistoquímico (Aubin et al., 1995).

Los factores implicados en la estimulación de la diferenciación de osteoblastos a formas maduras no están claramente delimitados, aunque en estudios *in vitro*, parece que BMP es un potente agente inductor de la diferenciación (Martinovic et al., 2006; Okamoto, Murai, Yoshikawa, & Tsumaki, 2006), así como lo son el fluoruro, 1,25(OH)₂-vitamina D y el ácido retinoico (Mundy et al., 1995; Ogston, Harrison, Cheung, Ashton, & Hampson, 2002).

2.3. Identificación

2.3.1. Identificación morfológica

2.3.1.1. Microscopía óptica

Los osteoblastos son células grandes que, al ser responsables de la formación de matriz ósea, se encuentran invariablemente en el frente de avance del hueso que crece o se desarrolla. Durante el depósito activo de nueva matriz, se disponen en una capa epiteloide de células cuboides o cilíndricas bajas conectadas unas con otras mediante expansiones cortas y finas.

El núcleo, con un nucleolo muy desarrollado, está con frecuencia en el extremo de la célula más distante de la superficie ósea. Las células están claramente polarizadas hacia el hueso subyacente. Su aparato de Golgi, bien desarrollado, está situado entre el núcleo y la base celular. Las mitocondrias son alargadas y bastante numerosas. El citoplasma es azulado (intensamente basófilo a causa de su elevado contenido en RNA), con un retículo endoplásmico rugoso muy desarrollado, característico de las células que llevan a cabo una intensa síntesis de proteínas.

Los osteoblastos dan una fuerte reacción histoquímica positiva para la fosfatasa alcalina, y la reacción del ácido peryódico-Schiff muestra vacuolas citoplasmáticas pequeñas que contienen gránulos rosados, a los que se supone precursores de la matriz ósea. Cuando cesa la neoformación activa de hueso y los osteoblastos adquieren forma de huso, tales gránulos desaparecen del citoplasma y la reacción de la fosfatasa se extingue rápidamente (Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil, Alobera-Gracia, del-Canto-Pingarron, & Blanco-Jerez, 2006).

2.3.1.2. Microscopía electrónica

En las micrografías electrónicas se observa que los osteoblastos tienen una estructura propia de células con una síntesis proteica intensa. El retículo endoplásmico es amplio y sus cisternas están dispuestas en un orden paralelo. Sus membranas están tachonadas de ribosomas y éstos están también presentes en gran número en la matriz citoplasmática. Las membranas del aparato de Golgi están bien desarrolladas y tienen muchas vacuolas asociadas. Unas vacuolas de buen tamaño, que contienen material amorfo o grumoso de apreciable densidad, corresponden al parecer a los gránulos que se tiñen por el PAS (reacción del ácido peryódico-Schiff), observados en la microscopía de luz. También se encuentran en ocasiones gotitas lipídicas y cuerpos densos limitados por membrana, que probablemente sean lisosomas (Tullberg-Reinert & Jundt, 1999).

2.3.2. *Identificación bioquímica*

Los estudios sobre células de aspecto osteoblástico han demostrado una serie de propiedades asociadas al fenotipo de estas células, como la secreción de osteocalcina,

osteopontina, síntesis de colágeno tipo I, actividad fosfatasa alcalina y producción de matriz mineralizada, entre otras.

2.3.2.1. Producción de osteocalcina

La osteocalcina o proteína ósea Gla, es sintetizada específicamente por los osteoblastos (Ducy et al., 1996) y representa alrededor del 15% de las proteínas no colagénicas de la matriz osteoide. Su molécula (49 aminoácidos) contiene tres restos de ácido gamma-carboxiglutámico y un aminoácido que “liga” iones calcio, entre sus dos grupos carboxilo. Como otras proteínas que poseen este aminoácido, su síntesis depende de la vitamina K (Dost, Ten Cate, & Wiemann, 2002).

La producción o el contenido de osteocalcina puede variar en presencia de determinados factores, así, disminuye con algunos aminoácidos como la arginina (Chevalley, Rizzoli, Manen, Caverzasio, & Bonjour, 1998) y aumenta en presencia de determinados factores de crecimiento como el factor de crecimiento fibroblástico (bFGF) (Globus, Patterson-Buckendahl, & Gospodarowicz, 1988). Su nivel sérico puede ser considerado como un indicador específico de la actividad de las células responsables del metabolismo ósea.

2.3.2.2. Producción de osteopontina

Esta proteína de 317 aminoácidos y con un 20% de su peso molecular correspondiente a ácido siálico, es sintetizada por los osteoblastos, osteocitos, condrocitos y fibroblastos. Tiene la capacidad de combinarse con la hidroxiapatita y también de facilitar el anclaje de las células óseas a la matriz mineralizada (Walker, Preston, Magnay, Thomas, & El Haj, 2001)

2.3.2.3. Actividad fosfatasa alcalina

El marcador bioquímico más utilizado para el reconocimiento del fenotipo osteoblástico es la actividad fosfatasa alcalina (ALP). Ésta es un enzima que libera fosfato inorgánico a partir de ésteres fosfóricos, con pH óptimo de acción de 8,6. Su

función no es del todo conocida aunque se cree que está involucrada en la mineralización ósea y está asociada a la membrana plasmática de los osteoblastos.

La localización de esta enzima por técnicas citoquímicas se utiliza para identificar poblaciones de osteoblastos en el hueso humano en desarrollo, así como los preosteoblastos del tejido conectivo mesenquimal y del estroma medular (Dodds, Merry, Littlewood, & Gowen, 1994).

Existen determinadas sustancias que incrementan la expresión de la actividad fosfatasa alcalina, como es la adición de una dosis farmacológica de arginina (Chevalley et al., 1998) o de glucocorticoides como la dexametasona (Dx) o FGF-2 (Walsh et al., 2000).

2.3.2.4. Respuesta a hormonas

En la formación de hueso intervienen gran cantidad de hormonas sistémicas entre las que se encuentran la paratohormona (PTH), el calcitriol, la insulina, calcitonina, hormonas tiroideas, hormonas sexuales y glucocorticoides, entre otras.

La paratohormona (PTH), a dosis bajas, estimula *in vitro* la proliferación de los osteoblastos y la síntesis de matriz osteoide. A dosis más elevadas, inhibe la replicación de los osteoblastos y estimula la reabsorción de cartílago y hueso por los osteoclastos, ya que la PTH tiene la capacidad de inducir la liberación de factores que liberan y/o activan a los osteoclastos (CSF-1, M-CSF, IL-1, IL-6 y factor de diferenciación osteoclástica) por parte de las células de linaje osteoblástico (Weir, Lowik, Paliwal, & Insogna, 1996; Romas et al., 1996; Yasuda et al., 1998; Onyia, Bidwell, Herring, Hulman, & Hock, 1995). Asimismo, PTH aumenta el número de nuevos lugares de formación de hueso y de volumen óseo (Horwitz, Tedesco, Gundberg, Garcia-Ocana, & Stewart, 2003), además, juega un papel importante en la regulación del metabolismo del calcio (Grey, 1997). La PTH también aumenta la apoptosis en osteoblastos, osteoprogenitores y osteocitos (Stanislaus et al., 2000).

El calcitriol, 1,25 (OH)₂-vit.D, inhibe *in vitro* e *in vivo* la proliferación y formación de los osteoblastos a partir de sus precursores; desempeña un importante

papel en la resorción ósea osteoclástica y en la formación ósea por los osteoblastos (Norman et al., 1996).

El 1,25 dihidroxicalciferol es el metabolito más efectivo de la vitamina D₃ o colecalciferol, constituye el principal regulador de la homeostasis del calcio y tiene efecto sobre varios tejidos, incluso muestra actividad antiproliferativa sobre células normales y malignas (Holick, 1995). Esta hormona tiene efectos sobre la apoptosis inducida por TNF- α , estimula la producción de osteocalcina y la actividad fosfatasa alcalina, como marcadores de osteoblastos maduros (Pascher, Perniok, Becker, & Feldkamp, 1999).

La insulina tiene acción anabolizante sobre el hueso. *In vitro* incrementa la incorporación de aminoácidos al hueso embrionario y estimula la síntesis de proteínas por los osteoblastos. *In vivo* se ha visto que el déficit insulínico inhibe la formación de cartílago y la osteogénesis (Cai et al., 2002).

La calcitonina es la principal hormona inhibidora de la resorción ósea, al disminuir la formación y la actividad de los osteoclastos. Estas células tienen abundantes receptores para esta hormona, y cuando se exponen a ella pierden su movilidad y la capacidad de reabsorber hueso (Kenny & Raisz, 2002; Villa et al., 2003).

Por otra parte, se han atribuido a las hormonas tiroideas una acción directa sobre las células osteoblasticas, acelerando su diferenciación, proliferación y actividad fosfatasa alcalina (Klaushofer et al., 1995).

Los glucocorticoides poseen receptores en los osteoblastos e inhiben la síntesis de matriz osteoide por estas células (Canalis, Pereira, & Delany, 2002).

La prostaglandina E₂ es un mediador de la formación y resorción de hueso. Producida por los osteoblastos induce la síntesis de matriz osteoide y estimula la reabsorción ósea *in vitro* e *in vivo* (Ohshiba, Miyaura, & Ito, 2003).

Los osteoblastos tienen receptores para los estrógenos, los que actúan inhibiendo la resorción ósea y está demostrado su efecto sobre la apoptosis de los osteoclastos (Hughes et al., 1996). La progesterona, por su parte, tiene una acción positiva directa sobre la formación ósea por los osteoblastos, acción que está facilitada por la presencia de estrógenos. La pérdida ósea que ocurre en muchas mujeres tras la menopausia o la extirpación ovárica precoz, obedecería fundamentalmente a la privación simultánea de estrógenos y progesterona (Rickard et al., 2002). Además, los estrógenos actúan indirectamente sobre algunos factores locales y sistémicos tales como PTH, calcitonina, vitamina D, prostaglandinas, factor de crecimiento semejante a la insulina 1 (IL-1), etc. (Franchi & Schinko, 1995).

También existen receptores en las células óseas para los andrógenos, que regulan distintos aspectos de células de linaje osteoblástico como la proliferación, diferenciación, mineralización, etc. Distintos estudios atribuyen a estas hormonas, efectos anabólicos y anti-reabsorción sobre el hueso, pudiendo estar mediados por factores como IGF-1, TGF- β e IL-6 (Hofbauer et al., 1999).

2.3.2.5. Producción de matriz mineralizada

La matriz extracelular está formada en un 90% por colágeno, principalmente tipo I, y en un 10% por proteínas no colagénicas. La mayoría de éstas son la osteonectina, osteocalcina, sialoproteínas, proteoglicanos, albúmina, etc. y se cree que participan activamente en la mineralización de la matriz. Los cristales de hidroxapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) constituyen la parte mineral del tejido óseo.

Existen estudios que demuestran que el colágeno tipo I es sintetizado por los osteoblastos durante los últimos periodos de proliferación y las primeras etapas de la maduración de la matriz (Stein, Lian, Stein, Van Wijnen, & Montecino, 1996).

2.3.3. *Identificación antigénica*

La caracterización antigénica de los osteoblastos es reciente, habiéndose descrito la expresión de distintos antígenos de membrana, que son coexpresados por células que tienen su origen en la médula ósea.

2.3.3.1. CD10

La molécula CD10 también es conocida como antígeno de la leucemia linfoblástica aguda (cALLa); es una glicoproteína con actividad endopeptidasa y está presente en la superficie de algunos tipos celulares: linfocitos pre-B, fibroblastos, “Stem cells”, células epiteliales renales, células deciduales estromales, etc. (Platt, LeBien, & Michael, 1983; Montes et al., 1996).

Se ha descrito mediante citometría de flujo la expresión del antígeno CD10 en determinadas poblaciones de osteoblastos humanos, lo que sugiere que la expresión de este antígeno puede ser una propiedad fenotípica de las poblaciones de osteoblastos y por tanto un nuevo marcador del fenotipo osteoblástico, que puede ser utilizado como dato complementario en la caracterización de esta población celular (Reyes-Botella, Montes, Abadia-Molina, Vallecillo-Capilla, & Ruiz, 1999).

2.3.3.2. CD44

La molécula CD44 (Underhill, 1993), es una molécula de adhesión funcional expresada en osteoblastos. Define una familia de glicoproteínas de superficie celular, que tienen capacidad de unirse al ácido hialurónico y por tanto son consideradas como receptores del mismo, que se encuentra presente en distintos tipos celulares: leucocitos, fibroblastos, células epiteliales y los propios osteoblastos (Miyake, Underhill, Lesley, & Kincade, 1990; Horton, 1995).

Entre las funciones que se les atribuyen está el reclutamiento de leucocitos hacia los tejidos (DeGrendele, Estess, Picker, & Siegelman, 1996) o la función de molécula coestimulante de linfocitos T (Galandrini, De Maria, Piccoli, Frati, & Santoni, 1994); sin embargo su papel a nivel de hueso no está claro, aunque es evidente que está involucrado en el reconocimiento matriz-célula.

Se ha comprobado que el antígeno CD44 se expresa en los cultivos de osteoblastos, concretamente durante el cambio de osteoblasto a osteocito (Reyes-Botella, Montes, Vallecillo-Capilla, Olivares, & Ruiz, 2000). Igualmente, Aubin y col.

incluyen la expresión de este antígeno en osteoblastos, aunque en menor intensidad que en osteocitos (Aubin et al., 1995).

2.3.3.3. CD54, CD80, CD86 y HLA-DR

Existen otras moléculas como CD54, CD80, CD86 y HLA-DR que ejercen algunas funciones descritas para el CD44. Estas moléculas están implicadas en los mecanismos de presentación antigénica y en la activación de células T. Para llevar a cabo esta función, las células presentadoras de antígenos desarrollan una primera señal que estimula las células T, a través del antígeno de clase II HLA-DR, y una señal coestimulante que depende de CD80 y CD86. Otras moléculas como el CD44 y CD54 complementan esta señal estimuladora.

Estos resultados son la base del estudio por distintos grupos de investigación del papel de estas células en funciones típicamente inmunológicas como la presentación de antígenos o la fagocitosis a nivel óseo (Stanley, VanDort, Motyl, Endres, & Fox, 2006; Schrum, Bost, Hudson, & Marriott, 2003; Schrum et al., 2003; Ruiz, Perez, Vallecillo-Capilla, & Reyes-Botella, 2003).

2.3.3.4. Expresión de otros antígenos

Los antígenos típicamente expresados en células hematopoyéticas han sido investigados en los osteoblastos humanos en cultivo, observándose una expresión negativa del CD45. Sin embargo, el anticuerpo CD34, que se asocia con un origen hematopoyético y está presente en células endoteliales y células hematopoyéticas inmaduras, es positivo en los osteoblastos humanos en cultivo. De los antígenos del linaje B, expresan CD20 y CD23 y no así CD19; mientras que el antígeno de células T (CD3) no se detecta. CD56, un antígeno de células NK, se detecta en una amplia proporción de células. Los antígenos del linaje mielomonocítico: CD11b, CD13, CD16 y CD36 son positivos y no así el CD14, CD15 y CD33. También se expresan antígenos como CD25 y CD38. El CD68 no se detecta en los cultivos. Finalmente cabe señalar la expresión positiva en el 100% de las células de antígenos específicos de las células foliculares dendríticas (FDC y DRC-1) (Reyes-Botella, Montes, Vallecillo-Capilla, Olivares, & Ruiz, 2002).

CD14 es una glicoproteína de cadena sencilla que se localiza fundamentalmente en la membrana de los monocitos, pero también se puede detectar en otras células como granulocitos, algunos macrófagos y células dendríticas. CD45, llamado antígeno común leucocitario, está presente en la mayoría de los leucocitos, por lo que se considera un antígeno con origen medular. Ambas moléculas, CD14 y CD45, no se detectaron en cultivos de osteoblastos (Reyes-Botella et al., 2002) lo que descartaba la contaminación por macrófagos.

El perfil antigénico descrito para los osteoblastos se ha basado en estudios con cultivos primarios de osteoblastos utilizando como técnica de estudio la citometría de flujo (Reyes-Botella et al., 2000; Reyes-Botella et al., 2002), no existiendo estudios que lo confirmen en células frescas o cortes de tejido.

2.3.4. Identificación genética

Durante años ha existido mucha dificultad en estudiar la diferenciación de los osteoblastos en comparación con otros linajes celulares debido al desconocimiento de proteínas específicas de osteoblastos. De hecho, muchas de las proteínas que expresan estas células son expresadas por otras, como los fibroblastos y condrocitos. Hasta hace poco se conocía un solo gen específico de osteoblastos, envuelto en el proceso de diferenciación de los mismos: la osteocalcina (Hauschka, Lian, Cole, & Gundberg, 1989; Desbois, Hogue, & Karsenty, 1994; Ducy et al., 1996). Sin embargo, estudios recientes en biología molecular, desarrollo biológico y estudios en genética humana y animal han identificado al gen *Cbfa1*, el cual es descrito como un factor de transcripción específico de osteoblastos así como una llave reguladora de su diferenciación (Karsenty, 2000; Ducy, 2000). Se expresa en los osteoblastos diferenciados y regula la expresión de osteocalcina, el último gen que se expresa durante la diferenciación osteoblástica (Ducy, 2000). La expresión de *Cbfa1* es regulada por distintos factores, como las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) (Ducy, Zhang, Geoffroy, Ridall, & Karsenty, 1997) así como por el propio gen (Ducy et al., 1999). Recientemente se ha demostrado que la proteína que codifica este gen está también implicada en los procesos de interacción epitelio-mesénquima de la morfogénesis dental (D'Souza et al., 1999).

2.4. Papel funcional del osteoblasto

Entre las funciones atribuidas a los osteoblastos destaca la formación de hueso. El hueso del adulto está sometido a un proceso de renovación en las llamadas unidades de *remodelación ósea*. Comienza con la osteólisis, a cargo de los osteoclastos, que liberan los minerales y degradan la sustancia osteoide. Las “lagunas” resultantes son reparadas por la osteogénesis subsiguiente, obra de los osteoblastos, que en primer lugar segregan la sustancia osteoide y después intervienen en su mineralización. Al final de la secuencia de remodelación, cuando no se requiere más síntesis de matriz ósea, los osteoblastos pierden su capacidad sintética y quedan como osteoblastos inactivos o bien resultan atrapados en el frente de calcificación, incluyéndose en el hueso como osteocitos, que tienen a su cargo la nutrición del tejido óseo y pueden desarrollar cierta actividad desmineralizante. La osteólisis y la osteogénesis están acopladas pero como muchos otros procesos biológicos el remodelamiento no es perfecto, de tal forma que al final de cada ciclo de resorción-formación queda un pequeño déficit de masa ósea, lo que explica que se asista a una pérdida paulatina de ésta a partir de la tercera o cuarta décadas (Kohrt, 2001; Martínez, Esbrit, Rodrigo, Álvarez-Arroyo, & Martínez, 2002).

Los factores que intervienen en este proceso son muchos, entre ellos podemos citar la paratohormona (PTH), la calcitonina, las hormonas tiroideas, los glucocorticoides, las hormonas sexuales, las prostaglandinas, factores de crecimiento, factor transformador de crecimiento β , somatomedinas, citoquinas como la interleucina-1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral (TNF), entre otros (Gurlek, Pittelkow, & Kumar, 2002; Schilephake, 2002). El hueso se remodela constantemente en ciclos secuenciales de formación y resorción, existiendo la evidencia de que ambas fases de este proceso están controladas por los factores secretados localmente (Mott et al., 2002).

En células osteoblásticas se han descrito algunos antígenos de superficie como las moléculas de adhesión CD44y CD54, las moléculas de clase II HLA (DR y DQ) y los antígenos CD80 y CD86 (Aubin et al., 1995; Reyes-Botella et al., 2000). Estas moléculas están implicadas en la activación de células inmunes (Galandrini et al., 1994; Seino et al., 1995; Lesley, Howes, Perschl, & Hyman, 1994). Estos resultados sugieren que los osteoblastos constituyen una población celular que comparte marcadores de superficie con algunas células inmunocompetentes conocidas, aunque mantiene

diferencias claras morfológicas, bioquímicas y antigénicas que le confiere un carácter propio. Estos estudios proponen que los osteoblastos pueden tener actividades directamente relacionadas con el sistema inmune.

En esta misma línea, distintos autores han descrito la capacidad de los osteoblastos de fagocitar pequeñas partículas de deshecho de biomateriales cuando son usados en implantes médicos (Lohmann et al., 2000; Vermes et al., 2000). Así mismo, Ruiz y col. comprueban, mediante estudios *in vitro* con cultivos primarios de osteoblastos humanos y tras 24 horas de incubación en presencia de distintas partículas diana, de diferente tamaño y naturaleza, que estas células presentan capacidad fagocítica (Ruiz et al., 2003). Entre las dianas utilizadas se encuentran bolitas de látex y distintos microorganismos como *Escherichia coli*, *Klebsiella* y *Candida albicans*. Mediante microscopía electrónica de transmisión se confirmó la presencia de las partículas incorporadas al citoplasma.

Heinemann y col. relacionan esta capacidad fagocítica con la expresión del antígeno CD68, marcador de los macrófagos, en cultivos de largo tiempo de evolución (Heinemann et al., 2000). Es más, especulan con la existencia de un fenotipo mixto con los macrófagos. Sin embargo, Reyes y col. describen una expresión negativa de este marcador en osteoblastos humanos en cultivo (Reyes-Botella et al., 2002).

La expresión de los antígenos CD44, CD54, CD80, CD86 y HLA-DR y esta capacidad para fagocitar microorganismos, está relacionada con las propiedades de ciertas células dendríticas que están especializadas en la presentación de antígenos, junto a la expresión del antígeno CD21, específico de las células foliculares dendríticas. Por tanto, estos resultados sugieren que durante la diferenciación de los osteoblastos, un subtipo de los mismos puede verse envuelto en funciones inmunológicas como la fagocitosis y la activación de linfocitos T. Como indican Heinemann y col. (Heinemann et al., 2000), la situación *in vitro* puede reflejar la situación *in vivo*. Ruiz y col. sugieren que los osteoblastos, al estar en contacto con microorganismos y material endoprotésico, pueden desempeñar funciones inmunológicas con el objetivo de eliminarlos (Ruiz et al., 2003). Lógicamente, el desempeño de esta actividad podría conllevar cambios morfológicos, antigénicos y bioquímicos.

Este nuevo rol atribuido a los osteoblastos puede llegar a ser muy importante en determinadas situaciones, como procesos inflamatorios relacionados con la liberación de citoquinas. Éstas pueden modular y acentuar la expresión del fenotipo antigénico del osteoblasto, e incluso, desarrollar funciones de tipo inmunitario (presentación de antígenos y fagocitosis), lo que podría detener parcialmente los procesos de diferenciación y maduración. Si bien, ello se propone como un mecanismo de emergencia y no como un proceso fisiológico.

3. FACTORES DE CRECIMIENTO Y CITOQUINAS

El hueso se remodela constantemente en ciclos secuenciales de formación y reabsorción. El balance entre la reabsorción y la formación óseas está influido por una serie de factores, interrelacionados entre sí, como son factores genéticos, mecánicos, vasculares, nutricionales, hormonales y locales, entre los que destacan los factores de crecimiento, las citoquinas (Dodds et al., 1994; Canalis, Economides, & Gazzero, 2003; Kessler, Kastler, Mayr-Wohlfart, Puhl, & Gunther, 2000) y recientemente se han implicado las proteínas de la matriz ósea, como moduladoras de la acción de otros factores locales. Las células del hueso también juegan un importante papel en este proceso, mediante la producción de prostaglandinas, óxido nítrico, citoquinas y factores de crecimiento que actúan de forma autocrina (Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil et al., 2006).

Tabla 1. Factores locales reguladores del remodelado óseo (Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil et al., 2006)

	ESTIMULAN FORMACIÓN	ESTIMULAN REABSORCIÓN	INHIBEN REABSORCIÓN
FACTORES DE CRECIMIENTO	BMP-2 (Proteína morfogenética ósea -2) BMP-4 (Proteína morfogenética ósea -4) BMP-6 (Proteína morfogenética ósea -6) BMP-7 (Proteína morfogenética ósea -7) IGF-I (Factor análogo a la insulina I) IGF-II (Factor análogo a la insulina II) TGF- β (Factor de crecimiento transformante- β) FGF (Factor de crecimiento fibroblástico) PDGF (Factor de crecimiento derivado de plaquetas) VDGF (Factor de crecimiento vascular endotelial)	TNF (Factor de necrosis tumoral) EGF (Factor de crecimiento epidérmico) PDGF (Factor de crecimiento derivado de plaquetas) FGF (Factor de crecimiento fibroblástico) M-CSF (Factor estimulante de colonias de macrófagos) GM-CSF (Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos)	
CITOQUINAS		IL-1 (Interleuquina-1) IL-6 (Interleuquina-6) IL-8 (Interleuquina-8) IL-11 (Interleuquina-11) PGE ₂ (Prostaglandina E-2) PGE ₁ (Prostaglandina E-1) PGG ₂ (Prostaglandina G-2) PGI ₂ (Prostaglandina I-2) PGH ₂ (Prostaglandina H-2)	IFN- γ (Interferón γ) IL-4 (Interleuquina-4)

3.1. Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento son polipéptidos que regulan la diferenciación, proliferación, migración y metabolismo celular. Sobre el hueso actúan incrementando el número de células de estirpe osteoblástica u osteoclástica y su expresión fenotípica (Sporn & Roberts, 1988; Baylink, Finkelman, & Mohan, 1993). Son sintetizados y secretados localmente por el tejido sobre el que actúan y regulan la síntesis de moléculas de adhesión específicas, que controlan la interacción célula-célula y célula-sustrato, como las superficies de implantes dentales o cualquier otro material protésico.

3.1.1. *TGF β* (*Transforming Growth Factor- β*)

Los factores de crecimiento transformantes β son una superfamilia de proteínas muy abundantes en el tejido óseo. Están presentes en la matriz en forma latente y se activan durante la reabsorción osteoclástica (Fox & Lovibond, 2005).

Son sintetizados por plaquetas, fibroblastos, células mesoteliales, condrocitos y osteoblastos.

TGF- β es un potente estimulador de la formación ósea, favoreciendo la mitogénesis de osteoblastos precursores, potenciando la diferenciación osteoblástica y la síntesis de la matriz osteoide (Pierce et al., 1992).

Los estudios de Reyes-Botella y col. (Reyes-Botella, Vallecillo-Capilla, & Ruiz, 2002) muestran un claro efecto estimulador del TGF- β sobre la proliferación de osteoblastos, que resultó ser dosis dependiente, resultados que coinciden con los obtenidos por Pfeilschiffer y col. (Pfeilschiffer et al., 1990).

Se ha demostrado que TGF- β también inhibe la reabsorción al reducir la formación y diferenciación de los osteoclastos, así como la actividad de los osteoclastos maduros y estimular la apoptosis (Baylink et al., 1993; Quinn et al., 2001)

3.1.2. FGF (*Fibroblastic Growth Factor*)

El factor de crecimiento fibroblástico es anabolizante óseo, ya que es mitógeno de los osteoblastos y de las células endoteliales vasculares, así como de los fibroblastos. Se conocen dos FGFs: ácido (aFGF) y básico (bFGF), con notable semejanza estructural entre ellos. Por su parte, bFGF aumenta la mitogénesis y el contenido de osteocalcina; sin embargo, produce una disminución de la actividad fosfatasa alcalina y de la síntesis de colágeno (Canalis, 1983).

Reyes-Botella y col (Reyes-Botella et al., 2002) demostraron que el FGF aumenta la actividad proliferativa y mitógena a nivel de células osteoblásticas alcanzando su máxima actividad a la concentración mínima ensayada. Si bien el tratamiento con FGF y TGF- β de manera simultánea, *in vitro*, no muestra un comportamiento sinérgico sobre células osteoblásticas.

Una serie de estudios muestran que TGF- β ejerce su acción en un estadio de la diferenciación osteoblástica distinto a aquel en el que actúa FGF (Stein & Lian, 1993). Así, FGF funciona como factor de crecimiento sólo en estadios tempranos del desarrollo de las células óseas, mientras que TGF- β actúa en fases más tardías de la diferenciación.

Asimismo, TGF- β y FGF aumentan la velocidad en que se produce la adhesividad de las células, lo que puede resultar de interés en mecanismos de osteointegración y podría utilizarse en la terapia implantológica (Reyes-Botella et al., 2002).

3.1.3. BMPs (*Bone Morphogenetic Proteins*)

Las progeínas morfogenéticas óseas están incluidas dentro de la familia de los TGF- β . Constituyen un grupo de 15 proteínas capaces de conseguir la transformación de tejido conjuntivo en tejido óseo, por lo que se consideran osteoinductivas (Chen, Zhao, & Mundy, 2004). Asimismo, son capaces de estimular la diferenciación de células pluripotenciales hacia diferentes líneas celulares (tejido adiposo, cartílago y

hueso). Son muy abundantes en el tejido óseo y durante la embriogénesis participan en la formación de hueso y cartílago.

Actualmente se las considera como los factores más potentes de la diferenciación osteoblástica (Yamaguchi, Komori, & Suda, 2000). Canalis y col. proponen que además de estimular la osteogénesis inhiben la osteoclastogénesis (Canalis et al., 2003).

3.1.4. EGF (*Epidermal Growth Factor*)

El factor de crecimiento epidérmico es un potente mitógeno de las células de origen mesodérmico y ectodérmico. En cultivos de células epiteliales, de condrocitos y de fibroblastos favorece la síntesis de DNA y la replicación celular. También estimula la replicación de fibroblastos y de células preosteoblásticas en el periostio. Esta molécula estimula la reabsorción de tejido esquelético, probablemente a través de PGE₂.

La síntesis de EGF por las células óseas no ha sido demostrada, al igual que ocurre con la síntesis de otros factores de crecimiento como PDGF (Platelet Derived Growth Factor) y FGF (Chan & Wong, 2000; Chaudhary & Hruska, 2001).

3.1.5. IGF-I y II (*Insulin-like Growth Factor I y II*)

Los factores de crecimiento análogos a la insulina son polipéptidos similares a esta hormona sintetizados por el hígado, otros tejidos no esquelético y por los osteoblastos. Los IGFs están regulados por hormonas y factores de crecimiento locales; así la somatotropa (GH), los estrógenos y la progesterona aumentan su producción, mientras que los glucocorticoides la inhiben. Así mismo, median en la interacción osteoblasto-osteoclasto e interfieren de forma activa en el remodelado óseo (Hill, Reynolds, & Meikle, 1995). Se ha demostrado que IGF-I modula el crecimiento de algunos tejidos como tejido nervioso, linfóide, dental, músculos, endotelial y óseo (Stewart & Rotwein, 1996).

Se conocen dos IGFs: IGF-I y el IGF-II, que se hallan en gran concentración en la matriz osteoide (Cohick & Clemmons, 1993). IGF-I estimula la replicación de las

células preosteoblásticas, incrementa la síntesis de matriz osteoide, estimula la síntesis de DNA y proteoglicanos en el cartílago y es capaz de inhibir la degradación de colágeno *in vitro* (Langdahl, Kassem, Moller, & Eriksen, 1998; Nasu, Sugimoto, Kaji, & Chihara, 2000).

In vitro estimula la diferenciación y la proliferación de osteoblastos, con aumento de la síntesis de colágeno tipo I, la producción de osteocalcina y la actividad fosfatasa alcalina. *In vivo*, IGF-I aumenta la masa y resistencia ósea en animales de experimentación (Baylink et al., 1993; Ammann, Rizzoli, Meyer, & Bonjour, 1996).

3.1.6. PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*)

El factor de crecimiento derivado de las plaquetas es producido y liberado por estas células durante su agregación. No se ha demostrado su síntesis en el tejido esquelético. Tiene una acción mitógena sobre los fibroblastos y las diferentes células precursoras presentes en el periostio. Por un lado estimula la síntesis protéica llevada a cabo por los osteoblastos y por otro, favorece la reabsorción ósea (Nash et al., 1994). Su papel fisiológico más importante parece ser estimular la replicación celular y la formación de nuevos vasos sanguíneos. Por ello se ha postulado que podría intervenir en la reparación de fracturas (Yang, Jin, Chen, Jing, & Wu, 2000; Gruber, Varga, Fischer, & Watzek, 2002).

3.1.7. VEGF (*Vascular Endotelial Growth Factor*)

El factor de crecimiento vascular endotelial induce la angiogénesis y la proliferación endotelial vascular. Produce vasodilatación y un incremento de la permeabilidad vascular (Ferrara, 2000).

VEGF desempeña un papel importante en la diferenciación de los osteoblastos, induciendo la actividad fosfatasa alcalina en osteoblastos primarios y aumentando su respuesta a la paratohormona. VEGF durante la diferenciación osteoblastica se expresa antes que otros marcadores como osteocalcina o la sialoproteína ósea. Así la expresión de VEGFs y sus receptores muestran una función importante en la regulación de la

remodelación ósea por atracción de células endoteliales y osteoclastos, así como la estimulación de la diferenciación osteoblástica (Deckers et al., 2000).

3.1.8. GM-CSF (*Granulocyte/macrophage-Colony Stimulating Factor*)

El factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos es importante para la osteoclastogénesis y puede intervenir en la patogenia de la osteopetrosis (Kim et al., 2005).

3.1.9. M-CSF (*Macrophage-Colony Stimulating Factor*)

El factor estimulador de colonias de macrófagos es producido por los osteoblastos y células del estroma medular y es requerido como factor esencial en las primeras fases de la osteoclastogénesis para la formación de células gigantes multinucleadas, pero no tiene efecto sobre la actividad osteoclástica (Kim et al., 2005).

3.2. Citoquinas

Son moléculas de naturaleza peptídica con actividad hormonal que por lo general actúan paracrinamente regulando las respuestas inmunitarias. Son polipéptidos secretados no sólo por linfocitos y macrófagos, sino también por células endoteliales, hepatocitos, células glias y otros tipos celulares. Poseen acciones inmunitarias reguladoras de actividades celulares y mediadoras de procesos diversos. Las citoquinas más estudiadas, con acción demostrada sobre el remodelado óseo, son: interleuquina-1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral (TNF), el Interferón- γ (IFN- γ) y las prostaglandinas (PGs). Todas comparten un efecto inhibitorio de la síntesis de la matriz osteoide y estimulador de la reabsorción ósea (Kumar et al., 2001).

La IL-1 estimula directamente la reabsorción osteoclástica, incrementando la proliferación y diferenciación de los pre-osteoclastos así como la actividad osteoclástica e inhibiendo la apoptosis de los osteoclastos (Compston, 2001). Existen tres moléculas diferentes: IL-1 α , IL-1 β y antagonista del receptor IL-1, siendo ésta última inhibidora del efecto de las dos primeras. Su acción sobre la reabsorción es directa e indirecta, a través de la síntesis de prostaglandinas.

Del TNF existen dos formas, α y β , ésta última también denominada como *linfotoxina*, produce prostanoïdes, citocinas y moléculas de adhesión en células endoteliales, es quimiotáctico de neutrófilos y macrófagos, y activa fibroblastos. El TNF- α , es producido principalmente por los linfocitos T activados y monocitos; es un potente regulador de la resorción ósea, pues es el principal responsable en la expresión del factor de diferenciación osteoclástica (ODF) sintetizada en osteoblastos y células estromales, de tal modo que, induce la formación de osteoclastos y su activación (Romas, Gillespie, & Martin, 2002).

Estudios recientes han identificado un ligando de la osteoprotegerina (OPG-L), como un nuevo miembro de la familia TNF y como factor esencial en la osteoclastogénesis, resorción y remodelación ósea. En algunos estudios se ha demostrado que IL-1 β , TNF- α pero no IL-6, pueden estimular la osteoclastogénesis induciendo la expresión de OPG-L. Estos datos muestran que un aumento en la producción de OPG-L seguido de la exposición de células osteoblasticas a IL-1 β , TNF- α , puede proporcionar un mecanismo paracrino importante por el que estas citoquinas proinflamatorias estimular la osteoclastogénesis, promoviendo la resorción ósea y la pérdida de hueso *in vivo* (Hofbauer et al., 1999).

Existen tres clases de interferón: IFN- α , el IFN- β y el IFN- γ . Éste último, es de producción restringida a linfocitos T activados por antígeno. Todos los interferones, tienen actividad antivírica y antitumoral, y únicamente el IFN- γ tiene un papel central en el control de la respuesta inmunológica (Takayanagi, 2005). IFN-beta por su parte, tiene la capacidad de inhibir la diferenciación de osteoclastos (Takayanagi, Kim, & Taniguchi, 2002) mientras que IFN- γ inhibe la reabsorción ósea (Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil et al., 2006).

Las prostaglandinas (PGs) *in vitro* favorecen la reabsorción ósea, fundamentalmente la PGE₂, pero también la PGE₁, PGG₂, PGI₂ y PGH₂ (Kawaguchi, Pilbeam, Harrison, & Raisz, 1995). Estudios *in vivo* han demostrado, mediante la medición de los niveles de prostaglandinas en el líquido crevicular, la participación de estas citoquinas en la destrucción ósea que tienen lugar en la enfermedad periodontal (Offenbacher, Heasman, & Collins, 1993).

Se ha descubierto que las proteínas de la matriz actúan como moduladores de los factores de crecimiento (Young, 2003), encontrándose en una concentración mil veces mayor que los factores de crecimiento, por lo que podrían tener un papel incluso más importante en la regulación de las distintas funciones celulares (Horowitz, 2003). Estas proteínas también participan en la regulación de la diferenciación de las células contenidas en la matriz. Así, el colágeno I es uno de los marcadores más tempranos que regulan las células osteoprogenitoras y la fosfatasa alcalina es una proteínas de superficie que podría participar en la regulación de la proliferación, migración y diferenciación de las células osteoblásticas.

4. PLASMA RICO EN PLAQUETAS

En los últimos años se han realizado muchos estudios dirigidos a profundizar en el conocimiento sobre regeneración ósea. En este sentido se estudian nuevas fuentes de factores de crecimiento, entre las que hay que destacar al plasma rico en plaquetas (PRP). También han sido objeto de estudio las técnicas para su obtención con el objetivo de acelerar y potenciar el efecto de los factores de crecimiento contenidos en las plaquetas. Así, en estudios previos tras analizar el concentrado plaquetario mediante la técnica de Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA) (R & System), se demuestra claramente que los factores de crecimiento son liberados por las plaquetas y alcanzan concentraciones elevadas debido a la centrifugación (Gonshor, 2002).

Debido al uso cada vez más extendido de los implantes y a la consiguiente necesidad de disponer de suficiente hueso para su colocación, recientemente se ha considerado la utilización del plasma procedente del propio paciente como fuente portadora de factores de crecimiento autólogos en distintas técnicas odontológicas que requieran reparación de tejido y formación del cayo óseo (Whitman, Berry, & Green, 1997; Lowery, Kulkarni, & Pennisi, 1999).

El plasma rico en plaquetas (PRP) o plasma rico en factores de crecimiento, se obtiene a partir de sangre autóloga mediante la técnica de plasmaferesis, con la ayuda de una centrifugadora portátil de uso general y técnicas de separación simplificadas, y posterior gelificación. Marx y col., en 1998, presentaron un caso de reconstrucción mandibular usando PRP activado con una mezcla de 10 ml de cloruro de calcio al 10% junto con trombina bovina como agentes gelificadores y los resultados fueron muy satisfactorios (Marx et al., 1998). Muchos otros autores en la literatura científica también han intentado profundizar en este tema y han descrito diversos métodos para la obtención del concentrado plaquetario, métodos que varían fundamentalmente en el tiempo de centrifugado, el número de centrifugaciones, las revoluciones y en la manipulación del concentrado plaquetario a la hora de adicionarlo a cualquier superficie (Anitua, 1999; Kassolis, Rosen, & Reynolds, 2000; Sonnleitner, Huemer, & Sullivan, 2000).

El gel obtenido consiste en una concentración de plaquetas suspendidas en un pequeño volumen de plasma (Marx, 2001), que actúa como vehículo portador de factores de crecimiento entre los que se incluyen: tres isómeros de PDGF (PDGF $\alpha\alpha$, PDGF $\beta\beta$ y PDGF $\alpha\beta$), dos de los numerosos TGF β (TGF β 1, TGF β 2), VEGF, EGF o IGF (IGF-I e IGF-II), todos ellos factores que son secretados activamente por las plaquetas para la cicatrización de heridas y que entre sus propiedades poseen la capacidad de acelerar la osteogénesis (Miyazono & Takaku, 1989; Kiuru, Viinikka, Myllyla, Pesonen, & Perheentupa, 1991; Marx et al., 1998).

El PRP además de factores de crecimiento, es portador de otras proteínas como fibronectina y ciertas proteínas adhesivas como la fibrina y la vitronectina que desempeñan un papel importante en la biología ósea, ya que actúan como moléculas de adhesión, para la osteoconducción, como matriz para el hueso y tejido conectivo y favorecen la migración epitelial.

El concentrado plaquetario actúa mediante la degranulación de los gránulos α de las plaquetas que son los que contienen los factores de crecimiento. La secreción activa de estos factores de crecimiento se inicia con el proceso de coagulación de la sangre y comienza en el plazo de 10 minutos después de la formación de coágulo. Este proceso activa a las plaquetas y los factores de crecimiento son secretados por las mismas a través de la membrana celular de la siguiente manera: los gránulos α se fusionan con la membrana celular de las plaquetas donde los factores de crecimiento se unen a histonas y carbohidratos, adquiriendo así un estado bioactivo.

Después de la primera liberación de factores, las plaquetas durante los siguientes siete días (tiempo de vida media de las plaquetas) sintetizan y secretan factores de crecimiento adicionales. Una vez que las plaquetas mueren, los macrófagos asumen la función de regular la cicatrización secretando más factores de crecimiento.

Se ha demostrado que células como osteoblastos, fibroblastos, células epidérmicas y endoteliales poseen receptores de membrana para los factores de crecimiento contenidos en el PRP (Marx et al., 1998). Una vez que se produce la unión receptor-factor de crecimiento, se activan una serie de señales internas que provocan la

expresión de una secuencia genética normal correspondiente bien a la proliferación celular, o a la formación de matriz osteoide, o a la síntesis de colágeno, etc. Estos datos apoyan la idea de que los factores de crecimiento del PRP no entran en la célula o en el núcleo de la misma y que actúa simplemente acelerando el proceso normal de cicatrización. De cualquier forma no existen estudios que demuestren el efecto del PRP sobre el ciclo celular o su capacidad mutagénica sobre las células sobre las que actúa, aspecto este de vital importancia ya que el PRP se está empleando para la reparación tanto de hueso como de tejido blando.

El PRP ha sido utilizado con éxito desde 1970. Fue Matras en 1970 quien utilizó plasma, obtenido mediante la centrifugación de la sangre, para obtener un gel de fibrina y aplicarlo en injertos de piel en ratones (Matras, 1970). Posteriormente, distintos estudios han mostrado los efectos beneficiosos del PRP en la reparación de úlceras cutáneas (Knighton et al., 1990; Lynch, 1991). Además estos beneficios se confirman en cirugía oral y maxilofacial (Carlson & Roach, 2002; Kassolis et al., 2000; Garg, 2000; Camargo et al., 2002; Kim, Chung, Kim, Park, & Lim, 2002) y en cirugía cosmética (Man, Plosker, & Winland-Brown, 2001; Adler & Kent, 2002).

Estudios previos, tanto animales como humanos han demostrado que la combinación de PRP con injerto óseo puede incrementar la tasa de osteogénesis así como como mejorar la formación ósea de una forma cualitativa (Fennis, Stoelinga, & Jansen, 2002; Fennis, Stoelinga, & Jansen, 2004; Marx et al., 1998). Sin embargo, de manera contradictoria, recientes estudios realizados sobre modelos caninos demuestran que la adición de concentrado plaquetario a injertos óseos retarda la formación de nuevo hueso (Choi et al., 2005).

Entre sus ventajas destaca el ser un material autólogo, que carece de toxicidad, no produce reacciones inmunológicas y su capacidad de acelerar y favorecer la neoformación ósea, además de ser un excelente osteoconductor y favorecer la cicatrización de las heridas (Carlson et al., 2002). En relación con su actuación a nivel de la neoformación ósea se desconoce la correlación dosis-respuesta aceptable de concentrado plaquetario y estimulación ósea, aunque se toma como referencia un incremento de 3-5 veces los valores iniciales de sangre completa (Marx, 2000).

Se ha investigado el uso del PRP en odontología como una forma de acelerar el proceso de cicatrización natural. Se ha aplicado en intervenciones de reparación de hueso, observándose un aumento en la velocidad de regeneración ósea así como en la cicatrización de tejidos blandos. También se observa un aumento en la densidad del hueso trabecular maduro (Marx et al., 1998).

Además el PRP se emplea para compactar y retener injertos, rellenar alvéolos postextracción, y en ciertas técnicas quirúrgicas como la colocación de implantes y como coadyuvante a la colocación de injertos óseos en elevaciones de seno, aunque con respecto a esto último los resultados muestran cierta controversia (Wallace & Froum, 2003; Boyapati & Wang, 2006).

El efecto del plasma rico cuando se asocia a injertos óseos, parece no aumentar la formación ósea según ciertos estudios en humanos (Roldan et al., 2004; Schlegel, Kloss, Schultze-Mosgau, Neukam, & Wiltfang, 2003; Wiltfang et al., 2004) estos efectos también se han evaluado en modelos caninos en los que tampoco se observó un aumento notable del crecimiento óseo debido al empleo del PRP (Choi et al., 2005).

Se han demostrado resultados muy beneficiosos del PRP en distintas situaciones clínicas como heridas de continuidad (Marx et al., 1998) elevaciones de seno con injertos (Kassolis et al., 2000; Lozada, Caplanis, Proussaefs, Willardsen, & Kammeyer, 2001), en aumentos de hueso por pérdida vertical u horizontal (Garg, 2000) y en defectos periodontales o periimplantarios (Kim et al., 2002). Además el PRP permite la integración adecuada de implantes de carga inmediata y proporciona una mejora en la óseo integración cuando se usa en situaciones comprometidas de hueso como en el caso de reconstrucciones con implantes en pacientes que han recibido radioterapia o en pacientes con osteoporosis.

Como el PRP también mejora la cicatrización de tejido blando, se ha utilizado con éxito en situaciones como injertos de paladar o de encía, injertos de mucosa para cubrir raíces, para recuperar zonas donantes de injertos de piel, en tratamientos faciales, blefaroplastias y en cirugía con láser.

El PRP por tanto, está siendo utilizado como instrumento de reparación de diferentes tejidos con un cierto éxito.

5. INFLAMACIÓN

La inflamación es una de las respuestas fisiológicas fundamentales con las que el organismo se defiende frente a agresiones producidas por gran variedad de estímulos (físicos, químicos, mecánicos o biológicos). Es un mecanismo inmunológico inespecífico cuyos objetivos son la eliminación del agente causal, la cicatrización del tejido dañado y el restablecimiento de la función normal (Flórez, 2002).

El conjunto de procesos que se suceden durante una respuesta inflamatoria depende de múltiples factores, como la naturaleza del estímulo desencadenante, su puerta de entrada o las características del huésped. Durante esta respuesta tiene lugar la liberación de mediadores inflamatorios que son los responsables de cambios vasculares, que a su vez originan los signos típicos de la inflamación: rubor, tumor, calor y dolor (Rocha, 1978; Benaroyo, 1994). Entre estos mediadores moleculares de la inflamación, cabe destacar:

- Proteínas plasmáticas, como las proteínas del sistema del complemento, las kininas, o las proteínas fibrinolíticas y de la coagulación.
- Mediadores lipídicos, como las prostaglandinas, los tromboxanos, leucotrienos y lipoxinas.
- Péptidos y aminos, como la Histamina, Serotonina, quimiocinas, citocinas (IL-1, IL-6, IL-12, TNF- β y el óxido nítrico (Connell & McInnes, 2006).

Durante el proceso inflamatorio no sólo intervienen mediadores moleculares, sino que también hay participación de distintos tipos celulares como los monocitos, los neutrófilos, los mastocitos, los macrófagos, los eosinófilos, las plaquetas, los linfocitos y las células endoteliales (Esplugues, 1993).

La respuesta inflamatoria puede dividirse en tres fases en las que intervienen mecanismos diversos. La fase aguda se caracteriza por vasodilatación local y el aumento de la permeabilidad capilar. Estos efectos son consecuencia de la degranulación de mastocitos que libera distintos mediadores de la inflamación. Muchos

de ellos actúan sobre las células de las paredes de los vasos aumentando su permeabilidad y vasodilatación. Esto permitirá la entrada de numerosas moléculas, como anticuerpos, factores del complemento y distintas proteínas, hacia el tejido dañado (Flórez, 2002).

En la fase subaguda se produce una infiltración leucocitaria y de células fagocíticas. Los leucocitos llegarán al foco inflamatorio atraídos por distintas moléculas de adhesión que se unen a sus ligandos. El reclutamiento, la activación y función de estas células no sólo depende de las moléculas de adhesión, sino de la participación concertada de diversos mediadores solubles con capacidad quimiotáctica (por ejemplo, factor C5a del complemento, factor activador de plaquetas y leucotrieno B₄), activadora (por ejemplo, factor de necrosis tumoral e IL-1) o moduladora (por ejemplo, la ejercida por la adenosina sobre los neutrófilos activados mediante receptores A₂). Por tanto la respuesta inflamatoria, es activada por las citocinas inflamatorias, tales como la IL-1, IL-6 o el TNF y citocinas TH1 (IFN γ), e inhibida por citocinas TH2 (IL-4, IL-10, TGF β -1) (Romanovsky et al., 2005).

Cuando el problema ya ha sido resuelto, se inicia el proceso de reparación, el cual constituye la última etapa de la respuesta inflamatoria. En esta etapa, es muy importante la participación de células fibroblásticas, además de citoquinas y ciertos mediadores biológicos, sobre todo en el tejido conjuntivo. Estas células producen fibras de la matriz extracelular e inducen la retracción de las heridas (Gillitzer & Goebeler, 2001).

5.1. Fármacos antiinflamatorios

5.1.1. AntiInflamatorios No Esteroideos (AINES)

Constituyen un grupo heterogéneo de compuestos, con frecuencia no relacionados químicamente (aunque muchos de ellos son ácidos orgánicos), que a pesar de ello comparten ciertas acciones terapéuticas y efectos colaterales.

La mayoría de los componentes del grupo de los AINES comparten las tres acciones que lo definen (analgésica, antitérmica y antiinflamatoria), sin embargo su

eficacia relativa para cada una de ellas puede ser diferente, es decir, un fármaco concreto puede mostrar una actividad analgésica mayor que otro y su toxicidad puede coincidir con la del grupo o ser específica. De ahí que su utilización clínica dependa tanto de su eficacia como de su toxicidad.

Tabla 2. Principales grupos de AINES (Flórez, 2002)

GRUPO FARMACOLÓGICO	FÁRMACO PROTOTIPO
<p>Ácidos</p> <p>Salicílico</p> <p>Enólicos</p> <p> Pirazolonas</p> <p> Pirazolidindionas</p> <p> Oxicams</p> <p>Acético</p> <p> Indolacético</p> <p> Pirrolacético</p> <p> Fenilacético</p> <p> Piranoindolacético</p> <p>Propiónico</p> <p>Antranílico</p> <p>Nicotínico</p>	<p>Ácido acetilsalicílico</p> <p>Metamizol</p> <p>Fenilbutazona</p> <p>Piroxicam y meloxicam</p> <p>Indometacina</p> <p>Ketorolaco</p> <p>Diclofenaco</p> <p>Etodolaco</p> <p>Naproxeno</p> <p>Ácido mefenámico</p> <p>Clonixina</p>
<p>No ácidos</p> <p>Sulfoanilidas</p> <p>Alcanonas</p> <p>Paraaminofenoles</p>	<p>Nimesulida</p> <p>Nabumetona</p> <p>Paracetamol</p>

5.1.1.1. Mecanismo general de acción

Los principales efectos terapéuticos y muchas de las reacciones adversas de los AINES pueden explicarse por su efecto inhibitorio de la actividad de la ciclooxigenasa, enzima que convierte el ácido araquidónico que se encuentra en las membranas celulares en endoperóxidos cíclicos inestables, los cuales se transforman en prostaglandinas y tromboxanos. Algunos de estos elementos, denominados eicosanoides, participan en grado diverso en los mecanismos no deseados de la inflamación, el dolor y la fiebre, por lo que la inhibición de su síntesis por los AINES es donde recae la actividad terapéutica los mismos (Samad & Abdi, 2001).

La existencia de varias isoformas de la ciclooxigenasa (COX-1, COX-2 y COX-3), con localizaciones y funciones diferentes, ha abierto nuevas perspectivas terapéuticas mediante el diseño de AINES que afecten selectivamente una u otras isoformas (Smith, DeWitt, & Garavito, 2000; Pilbeam et al., 1995; Tjandrawinata, Dahiya, & Hughes-Fulford, 1997)

La COX-1 tiene características de enzima constitutiva, y su actividad tiene que ver con la participación de las PG y tromboxanos en el control de funciones fisiológicas (Seibert et al., 1997). Su inhibición por los AINES puede dar lugar a ulceraciones y hemorragias gástricas (Lichtenstein, Syngal, & Wolfe, 1995). En cambio, la COX-2 tiene características de enzima inducible, en determinadas células, bajo circunstancias patológicas por el concurso de diversas citoquinas, hormonas y mediadores de la inflamación. Las dos isoformas se expresan en circunstancias fisiológicas, pero si existen diversos procesos inflamatorios, la expresión de la COX-2 aumenta hasta 20 veces, mientras la expresión de la COX-1 no se afecta o lo hace en menor grado (2-3 veces). La expresión de la COX-2 es provocada por diversos mediadores inflamatorios (interferón γ , factor de necrosis tumoral- α , interleucina-1, factores de crecimiento, etc.) en diversas células (monocitos, macrófagos, células endoteliales, condrocitos y osteoblastos) y tejidos (sistema nervioso central, estómago, riñón, pulmón y ciertos tejidos afectados por procesos neoplásicos (Breder, Dewitt, & Kraig, 1995; Kargman et al., 1996; Harris et al., 1994). La expresión preferente de la COX-2 en diversas situaciones patológicas sugiere nuevas indicaciones terapéuticas para sus futuros inhibidores selectivos. Entre estas destacan el tratamiento de lesiones nerviosas, el

dolor, el asma así como la terapéutica coadyuvante de adenomas y carcinomas del intestino grueso. Un tercer tipo de ciclooxigenasa, la COX-3, es de localización cerebral y es inhibida selectivamente por el paracetamol (Hersh, Lally, & Moore, 2005).

La inmensa mayoría de los AINES inhiben de manera no selectiva la actividad enzimática de las isoformas 1 y 2, o en todo caso, en mayor medida la de la COX-1, aunque los mecanismos de la inhibición sean algo diferentes. Así, el ácido acetil salicílico es un inhibidor irreversible de ambas ciclooxigenasas y la práctica totalidad de los restantes AINES, incluidos los salicilatos, inhiben la enzima de forma estereoespecífica, competitiva y reversible.

5.1.1.2. Acciones farmacológicas

5.1.1.2.1. Acción analgésica

La acción analgésica de los AINES es de intensidad media o moderada, alcanzándose un techo analgésico claramente inferior al de los opioides, pero frente a estos presentan la ventaja de no alterar ni la percepción ni la sensibilidad.

Esta acción analgésica tiene lugar a nivel periférico, fundamentalmente mediante la inhibición de la síntesis de prostaglandinas que se producen en respuesta a agresiones o lesiones tisulares, impidiendo que los eicosanoides contribuyan a aumentar la acción estimulante de dolor de mediadores como histamina o bradiquinina que son liberados en el lugar de la agresión (McCormack & Brune, 1991; Brune & Beck, 1991; Bannwarth, Demotes-Mainard, Schaeffer, & Dehais, 1993).

5.1.1.2.2. Acción antitérmica

El desencadenamiento de una reacción febril implica la existencia de pirógenos endógenos (citoquinas como IL-1 β , IL-6, TNF α e interferones β y γ) o tóxicos (endotoxinas o lipopolisacáridos) en áreas del sistema nervioso central relacionadas con el control de la temperatura. El reconocimiento de estos pirógenos origina la síntesis de prostaglandinas, principalmente PGE₂, como primer paso en la patogénesis de la fiebre.

La acción antitérmica de los AINES es consecuencia de su efecto inhibitor central de la síntesis de prostaglandinas (Werner, Souza, & Zampronio, 2006) .

5.1.1.2.3. Acción antiinflamatoria

Al inhibir la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos, los AINES reducen su actividad sensibilizadora a nivel de las terminales nerviosas, así como la actividad vasodilatadora y quimiotáctica, interfiriendo de esta forma en uno de los mecanismos iniciales de la inflamación (Samad et al., 2001). Además estos fármacos pueden interferir en diversas funciones de los neutrófilos como la adhesividad, la agregación, la quimiotaxis, la fagocitosis, la degranulación y la generación de radicales libres. Además, la mayoría de los AINES tienen la capacidad de inhibir o reducir la adhesión de los leucocitos polimorfonucleares al endotelio y algunos, de inhibir el aumento de la expresión de determinadas moléculas de adhesión celular (como selectina E, ICAM-1 y VCAM-1) en células endoteliales estimuladas.

La capacidad de los AINES para reducir la inflamación es variable dependiendo del tipo de proceso inflamatorio (en general son mas eficaces frente a inflamaciones agudas que crónicas), de la participación relativa de algunos eicosanoides en él y también de la posibilidad de que actúen, además, por mecanismos de acción independientes de la inhibición de las ciclooxigenasas (Bannwarth et al., 1993; Samad et al., 2001).

5.1.1.2.4. Acción antiagregante

Esta acción, es consecuencia de su efecto inhibitor sobre la COX-1. Las plaquetas, son incapaces de sintetizar nuevas proteínas y una vez acetilada su COX, resulta inhibida durante toda la vida de la plaqueta. Como consecuencia, se produce un marcado descenso de los niveles de TXA₂ plaquetario, responsable de parte de los mecanismos que provocan la agregación plaquetaria (Schafer, 1995). Por ello, los AINES, se utilizan en la prevención a largo plazo de accidentes tromboembólicos coronarios y cerebrales, aunque puede devenir como reacción adversa, facilitando la aparición de hemorragias.

Una ventaja importante del acetaminofén en comparación con los otros AINES es que no afecta la función plaquetaria, lo que disminuye su riesgo de uso en pacientes trombocitopénicos.

5.1.1.2.5. Acción uricosúrica

Es consecuencia de la inhibición del transporte de ácido úrico desde la luz del túbulo renal hasta el espacio intersticial. Se trata de un proceso de competencia en el transporte de ácidos orgánicos que sólo es apreciable con algunos AINES (por ejemplo, dosis elevadas de salicilato, fenilbutazona y sulfpirazona) (Flórez, 2002).

5.1.1.2.6. Acción anticancerígeno

Se ha demostrado cierta actividad antitumoral de determinados AINES, como el Meloxicam, sobre células cancerígenas de colon (Goldman et al., 1998), de pulmón (Tsubouchi et al., 2000) y de hueso (Naruse, Nishida, Hosono, & Ishiguro, 2006). Del mismo modo ocurre con el Celecoxib, que inhibe la proliferación celular en células de osteosarcoma humano (Wang et al., 2004). Incluso se ha demostrado que ciertos AINES, inducen la apoptosis celular en líneas celulares tumorales y disminuyen la capacidad de producir metástasis (Qiao, Hanif, Sphicas, Shiff, & Rigas, 1998; Naruse et al., 2006; Wolfesberger, Walter, Hoelzl, Thalhammer, & Egerbacher, 2006).

5.1.1.3. Reacciones adversas

El uso de AINES se asocia con toxicidad gastrointestinal leve (dispepsia, ardor epigástrico, náusea, vómito, anorexia, diarrea, estreñimiento, flatulencia, sensación de llenura, dolor epigástrico y abdominal) o graves (sangrado, úlceras, perforación) ya que los AINES, pueden alterar la hidrofobicidad de la mucosa gástrica, pueden favorecer la retrodifusión de iones de hidrógeno y contribuir al desarrollo de daño tisular (Lichtenberger et al., 1995).

El efecto regulador del flujo sanguíneo y la protección gástrica, parece ser mediado preferentemente a través de la COX-1 (Hirata, Ukawa, Yamakuni, Kato, & Takeuchi, 1997). La inhibición de la COX-1 por parte de los AINES, reduce la

formación de prostaglandinas que son fundamentales para el mantenimiento de la integridad de la mucosa gástrica (Warner et al., 1999; Whittle, 1980). Así existe una correlación entre el grado de inhibición de la COX y la aparición de lesiones en la mucosa gástrica, aunque parece que éstas sólo se producen cuando existe una inhibición simultánea de la COX-1 y la COX-2 (Wallace, McKnight, Reuter, & Vergnolle, 2000; Wallace, 2000; Langenbach et al., 1995).

La toxicidad hepática y renal puede ocurrir en cualquier momento durante el tratamiento con AINES, pero es más común durante el uso crónico, aunque el riesgo de toxicidad renal es mayor en pacientes con edad avanzada, enfermedad renal preexistente, insuficiencia cardíaca, alteraciones en la función hepática, hipovolemia y terapia concomitante con otros fármacos nefrotóxicos. Parece que existe acuerdo en que la indometacina es el más nefrotóxico. Por el contrario, el sulindaco, el piroxicam, el meloxicam y los salicilatos no acetilados parece que respetan en mayor grado la función renal (Mehlich, Markenson, & Schnitzer, 1999).

Los AINES se unen ampliamente a las proteínas plasmáticas y por lo tanto pueden desplazar otros fármacos como el metotrexate, la digoxina, la ciclosporina, los hipoglicemiantes orales y derivados de las sulfamidas, pudiendo aumentar así los efectos terapéuticos o tóxicos de cada uno de estos fármacos.

También han sido descritas ciertas reacciones de hipersensibilidad frente a AINES, que pueden ser de carecer alérgico (angioedema y shock anafiláctico) o pseudoalérgico (rinorrea, vaso dilatación facial y el asma bronquial) (Flórez, 2002).

5.1.2. Antiinflamatorios Esteroideos (corticosteroides)

La corteza suprarrenal secreta dos tipos de hormonas esteroideas, las sexuales, especialmente andrógenos, y los corticoides, existiendo en estos últimos dos clases, los glucocorticoides y los mineralcorticoides. Estas hormonas tienen como precursor común el colesterol.

Los mineralcorticoides, representados fundamentalmente por la aldosterona, actúan sobre el metabolismo del agua y de los electrolitos. Los glucocorticoides afectan

al metabolismo de los hidratos de carbono, los lípidos y las proteínas, y las principales sustancias de este grupo son la hidrocortisona y la corticosterona; los glucocorticoides presentan también cierta acción mineralcorticoide y, además de sus efectos metabólicos, son sustancias provistas de acción antiinflamatoria e inmunosupresora. Estas dos últimas acciones son las que tienen más aplicación en terapéutica.

Los corticosteroides semisintéticos se obtienen mediante la modificación de la estructura química de los naturales, cortisona o hidrocortisona, mediante introducción de dobles enlaces, grupos hidroxilo o grupos metilo. De este modo disminuye la actividad mineralcorticoide y mejora la glucocorticoide (Adcock, Caramori, & Ito, 2006). El grupo de esteroides sintéticos incluye: prednisona, prednisolona, metilprednisolona y dexametasona, entre otros.

5.1.2.1. Mecanismo de acción

Los receptores de los glucocorticoides, al igual que los de otras hormonas esteroideas, pertenecen a la superfamilia de receptores esteroideos y están localizados intracelularmente. Los esteroides penetran en las células por difusión pasiva y se fijan a su receptor específico de carácter proteico, dando lugar a un complejo receptor-esteroide que penetra en el núcleo de la célula. En una segunda fase el complejo receptor-esteroide activado, sufre un proceso de traslocación y se fija al ADN en el núcleo dando lugar a la formación de ARN y a la correspondiente síntesis de proteínas (lipoproteínas) que, en última instancia, median los efectos fisiológicos o farmacológicos del esteroide (Gustafsson et al., 1987; Ratka, Sutanto, Bloemers, & de Kloet, 1989).

Una de estas lipoproteínas es la lipocortina, una proteína antiinflamatoria que actúa inhibiendo la fosfolipasa A_2 , disminuyendo así la producción tanto de prostaglandinas y demás eicosanoides como de leucotrienos.

Por el contrario, los antiinflamatorios no esteroideos bloquean únicamente la ciclooxigenasa, con lo que no sintetizan los eicosanoides pero sí los leucotrienos. Esto explicaría la mayor potencia antiinflamatoria de los glucocorticoides.

5.1.2.2. Acciones farmacológicas

5.1.2.2.1. Efectos metabólicos

Favorecen la acumulación de glucógeno en el hígado y estimulan la gluconeogénesis. Además tienen la capacidad de disminuir la captación periférica de glucosa y tienden a elevar la glucemia por lo que muestran un efecto diabetogénico. Pueden producir un incremento del catabolismo, con movilización de aminoácidos de los tejidos y el consiguiente balance nitrogenado negativo. Además tienen la capacidad de producir un incremento de la reabsorción de sodio, agua y aniones a nivel del túbulo distal e incrementar la eliminación de potasio.

5.1.2.2.2. Efecto antiinflamatorio

Los glucocorticoides ejercen una importante acción antiinflamatoria, inespecífica e independiente del agente causante de la inflamación lo que representa la base fundamental de su uso en la clínica. Tienen la capacidad de inhibir la dilatación vascular, de reducir la transudación líquida y la formación de edema, disminuyen el exudado celular y reducen el depósito de fibrina alrededor del área inflamada. Además pueden inhibir el acceso de los leucocitos al foco inflamatorio, interfieren en la función de los fibroblastos y de las células endoteliales. Además suprimen la producción o los efectos de numerosos mediadores químicos de la inflamación. Por todo ello son capaces de inhibir las manifestaciones de la inflamación, tanto las inmediatas como las tardías, entendiendo por tales procesos la cicatrización y proliferación celular.

5.1.2.2.3. Otros efectos

Los corticosteroides poseen además propiedades antialérgicas, ya que producen una supresión inespecífica de la respuesta inflamatoria. Incrementan la producción de ácido clorhídrico y pepsina y reducen la barrera protectora de moco en el estómago.

A dosis excesivas, los glucocorticoides provocan catabolismo proteico a nivel muscular y en el hueso, también a dosis alta, reducen la absorción de calcio (Baylink, 1983).

Con respecto al estado de ánimo, pueden ocasionar euforia y a veces depresión.

5.1.2.3. Reacciones adversas

Por su capacidad de inhibir la secreción de factor hipotalámico (CRF) y corticotropa (ACTH) producen modificaciones en la hipófisis y en las cápsulas suprarrenales en proporción a la dosis administrada y a la duración de la administración. Si la duración es corta, entre 7 y 10 días, la función adrenal se recupera de inmediato, pero si se prolonga más de dos semanas, los cambios atróficos se establecen de manera que, al suspender bruscamente la medicación corticotropa, sobreviene una insuficiencia suprarrenal aguda (Oelkers, 1996).

Las acciones antiinflamatoria e inmunodepresora facilitan la aparición de infecciones fúngicas, víricas y bacterianas (Marx, 1995).

Debido a su acción a nivel músculo-esquelético, en ocasiones pueden producir miopatías con debilidad de la musculatura proximal de las extremidades. Tienen la capacidad de reducir la actividad regeneradora del epitelio, alteran la barrera mucosa y, en ocasiones, aumentan la acidez del jugo gástrico, por lo que parecen que incrementa la incidencia de úlceras pépticas (Spiro, 1983). Aumentan también la incidencia de pancreatitis. Además, pueden ocasionar alteraciones fisiológicas en forma de cambios de humor y psicopatías de tipo maníaco-depresivo o esquizofrénico.

5.1.2.4. Aplicaciones terapéuticas

Se deben administrar como terapia sustitutiva en los distintos cuadros de insuficiencia suprarrenal, pero la causa de su extendido uso reside en su doble acción, antiinflamatoria e inmunodepresora, mediante la cual controlan situaciones que así lo requieran, como en las enfermedades autoinmunes o reacciones alérgicas.

En odontología los glucocorticoides se utilizan especialmente para el tratamiento de ulceraciones bucales en las que normalmente se obtienen un alivio de los síntomas cualquiera que sea su causa (estomatitis aftosa, liquen plano erosivo, pénfigo, gingivitis,

queilitis, eritema multiforme, úlceras traumáticas y por roce de prótesis). En el caso de las úlceras de origen herpético está contraindicado.

5.2. Antiinflamatorios en odontología

Por su mecanismo de acción, los antiinflamatorios no esteroideos son los fármacos más eficaces para prevenir el dolor de tipo inflamatorio. En la práctica clínica odontológica diaria, teniendo en cuenta sus mecanismos de acción y los efectos adversos que producen, algunos de los AINES más utilizados son el Paracetamol (generalmente 1 gramo cada ocho horas) y el Ibuprofeno (600 mg cada 8 horas). Como evitan la síntesis de prostaglandinas, pero no los efectos de las prostaglandinas ya sintetizadas, deben administrarse, si es posible, antes de que aparezca el cuadro inflamatorio. Evidentemente, esto no es posible en muchos casos pero sí en algunos otros como podría ser la extracción de un tercer molar incluido. En estos casos deberá administrarse el antiinflamatorio antes de que empiece a desaparecer el efecto del anestésico local. Al ser los antiinflamatorios no esteroideos sustancias que poseen además una potente acción analgésica se convierten en los fármacos de elección para este tipo de procesos (Flórez, 2002; Esplugues, 1993).

Además de los AINES, hay ciertos procedimientos clínicos odontológicos que conllevan una agresión importante de los tejidos orofaciales, fundamentalmente del tejido óseo, algunos ejemplos podrían ser las intervenciones quirúrgicas maxilofaciales como quistectomías o cirugías para la colocación de fijaciones orales (implantes). En estas situaciones muchas veces se recurre a la administración de una dosis única de metilprednisolona justo después de la intervención con objeto de minimizar en la medida de lo posible los efectos de los procesos inflamatorios (Esplugues, 1993).

Debido a la elevada frecuencia de procesos inflamatorios y dolorosos que se tratan a diario en la clínica dental, y a la creciente realización de cirugías para la colocación de implantes dentales en los procesos de rehabilitación oral, podríamos decir que tanto los AINES como ciertos glucocorticoides, como la Metilprednisolona, son empleados prácticamente a diario en la clínica dental, fármacos que como se describe a continuación no son inocuos para los tejidos maxilofaciales, sino que ejercen ciertos efectos perjudiciales, fundamentalmente sobre el hueso.

5.3. Antiinflamatorios y osteoblastos

Los AINES son un grupo de medicamentos de los más prescritos, con múltiples indicaciones terapéuticas como el tratamiento de dolencias músculo esqueléticas y cefaleas. También son utilizados para conseguir analgesia y disminución de la inflamación en pacientes en la fase de recuperación postoperatoria tras intervenciones quirúrgicas que afecten fundamentalmente al tejido óseo, como tras la colocación de implantes dentales o la extracción de terceros molares incluidos en el campo de la odontología (Esplugues 1993). Sin embargo, distintos estudios han demostrado que ciertos fármacos antiinflamatorios pueden alterar el crecimiento, el remodelado e incluso la reparación de hueso (Khokher & Dandona, 1988; Kawaguchi, Pilbeam, Harrison, & Raisz, 1995; Ho, Chang, & Wang, 1995; Tornkvist & Lindholm, 1980; Keller, Bunger, Andreassen, Bak, & Lucht, 1987).

Una de las hipótesis que avalan esta idea es el efecto inhibitorio de los AINES sobre la enzima ciclooxigenasa que tiene un papel fundamental en la síntesis de prostaglandinas. Las prostaglandinas constituyen uno de los múltiples reguladores del metabolismo óseo ya que actúan modulando la proliferación y diferenciación de los osteoblastos. Distintos estudios apoyan la idea de que, dado que los AINES actúan bloqueando la síntesis de prostaglandinas por vía de la ciclooxigenasa, y las prostaglandinas tienen un papel regulador a nivel óseo, el bloqueo que producen los antiinflamatorios sobre la síntesis de esas citoquinas podría ser el mecanismo por el que los AINES pueden provocar la inhibición de la reparación ósea (Norrdin, Jee, & High, 1990; Ho, Chang, Chuang, Hsu, & Wang, 1999). En este sentido se ha comprobado que ciertos antiinflamatorios no esteroideos, como el ketorolaco o la indometacina (potentes inhibidores de la síntesis de prostaglandinas) presentan un efecto supresor del remodelado óseo mediante la inhibición de la proliferación de osteoblastos *in vitro* (Ho et al., 1999; Ho, Chang, & Wang, 1998; Ho et al., 1995). Si bien otros autores apoyan la idea de que es precisamente ese efecto inhibitorio de la síntesis de prostaglandinas el que protege frente a la pérdida de hueso en ciertas situaciones patológicas (Armour et al., 2001). Estudios epidemiológicos han demostrado que aquellos individuos que son tratados con ciertos AINES tienen una mayor masa ósea cuando se comparan con pacientes que no reciben esos tratamientos, incluso experimentan una reducción considerable en los valores de marcadores de reabsorción de hueso (Morton, Barrett-

Connor, & Schneider, 1998; Lane, Bauer, Nevitt, Pressman, & Cummings, 1997). Paralelamente, se ha descrito en cultivos celulares de osteosarcoma humano tratados con indometacina, que ésta, provoca una inhibición significativa sobre la proliferación celular, de forma dosis dependiente, tras 48h de tratamiento (Evans & Butcher, 2004).

Cabe señalar que las prostaglandinas exógenas, que no son sintetizadas por el propio osteoblasto, tienen un efecto doble sobre la proliferación osteoblástica, por lo que, pueden ser estimuladoras o inhibidoras según su concentración (Fujimori, Tsutsumi, Fukase, & Fujita, 1989; Kawaguchi et al., 1995b; Mori, Jee, Li, Chan, & Kimmel, 1990), aunque hay autores que afirman que la inhibición de la proliferación de estas células es independiente del bloqueo de la síntesis de prostaglandinas.

Además del efecto de los AINES sobre la proliferación celular, ciertos estudios indican que algunos antiinflamatorios tienen efecto a nivel del ciclo celular e incluso inducen la apoptosis de distintos tipos celulares (Zhang, Tu, Zhang, Zhou, & Zheng, 2000; Hanif et al., 1996; Rahman et al., 2000; Piazza et al., 1997; Shiff, Koutsos, Qiao, & Rigas, 1996).

Aunque los AINES son de gran utilidad clínica, su uso se ve limitado por la posible aparición de efectos adversos, como pueden ser la enfermedad ulcerosa péptica o la insuficiencia renal. Estos efectos secundarios afectan incluso al tejido óseo, pudiendo inhibir la reparación y la cicatrización ósea (Langman et al., 1994; Muscara, McKnight, Asfaha, & Wallace, 2000; Altman et al., 1995; DiCesare, Nimni, Peng, Yazdi, & Cheung, 1991). En este sentido, Van Staa y cols., en el año 2000, demuestran que los pacientes que toman AINES tienen mayor riesgo de sufrir una fractura, que los que no los toman (van Staa, Leufkens, & Cooper, 2000). También se ha observado, que estos fármacos disminuyen el crecimiento óseo entorno a implantes dentales (Keller, Trancik, Young, & St Mary, 1989) y retrasan la formación del callo óseo, en pacientes con fracturas (Giannoudis et al., 2000).

Otro aspecto, no menos importante, es como los AINES pueden interferir en la proliferación de las células tumorales. Muchos estudios, evidencian el papel crucial de la COX-2 en diferentes aspectos de la carcinogénesis y en la prevención y el tratamiento de las alteraciones inflamatorias. Esta enzima está sobreexpresada en diferentes tumores

malignos como en el tumor de colon (Eberhart et al., 1994), el de próstata (Gupta, Srivastava, Ahmad, Bostwick, & Mukhtar, 2000), de mama (Hwang, Scollard, Byrne, & Levine, 1998), de pulmón (Watkins, Lenzo, Segal, Garlepp, & Thompson, 1999) y en el de hueso (Naruse et al., 2006). Se ha observado que los inhibidores selectivos de la COX-2, disminuyen la formación, el crecimiento y la metástasis de tumores experimentales (Yao et al., 2003; Sheng et al., 1997). En este sentido ciertos estudios han observado una disminución del riesgo de padecer cáncer de colon en aquellos pacientes que ingieren de manera regular fármacos inhibidores de la COX-2 (Thun, Henley, & Patrono, 2002; Foslien, 2000).

A nivel del tejido óseo, los AINES, parecen ejercer una acción similar a la descrita en otras poblaciones tumorales. En células de osteosarcoma humano, de la línea celular MG-63, se ha demostrado que el tratamiento con celecoxib inhibe la proliferación de forma dosis dependiente y aumenta la concentración del calcio intracelular (Wang et al., 2004), mientras que, el tratamiento con meloxicam, disminuye la proliferación celular, y la capacidad invasiva (Naruse et al., 2006).

Por su parte los glucocorticoides juegan un importante papel en la regulación del remodelado óseo. Hace aproximadamente 70 años Harvey Cushing reconoció por primera vez los efectos adversos de los glucocorticoides a nivel óseo en el contexto de la enfermedad que lleva su nombre (Cushing, 1932), efectos entre los que destaca el desarrollo de osteoporosis, un problema que está aumentando considerablemente en las últimas décadas debido al uso de glucocorticoides sintéticos, como la metilprednisolona, para el tratamiento de distintas enfermedades inflamatorias (van Staa et al., 2000). El mecanismo por el que se produce este fenómeno incluye una fase en la que existe un incremento notable de la reabsorción seguido de una disminución de la formación ósea. Este efecto es debido fundamentalmente a la acción de glucocorticoides a nivel de las células óseas, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos (Cooper, Hewison, & Stewart, 1999; Manolagas, 2000).

In vivo, los glucocorticoides estimulan la resorción ósea, probablemente por la estimulación de enzimas implicadas en el proceso de eliminación de matriz mineralizada que acontece en los fenómenos de remodelado óseo, y disminuyen la formación de hueso (Delany, Dong, & Canalis, 1994; Delany, Jeffrey, Rydziel, &

Canalis, 1995). Por ejemplo, bajas dosis de prednisona a pacientes con incipiente artritis reumatoide aumenta el riesgo de fracturas óseas no sólo debido a una reducción de la densidad mineral ósea sino también por producir cambios en la estructura y resistencia del hueso (van Everdingen, Siewertsz van Reesema, Jacobs, & Bijlsma, 2003).

In vitro ciertos estudios han demostrado que, mientras que los glucocorticoides estimulan la diferenciación osteoblástica, tienen también una importante acción inhibitoria sobre la formación ósea, inhibición que según Canalis y col. (Canalis, 2005) es causado por una inhibición de la diferenciación y un incremento en la apoptosis de osteoblastos y osteocitos maduros. Hay que destacar que, además del efecto de estos fármacos sobre el hueso también se han descrito ciertos efectos inhibitorios a nivel del crecimiento de células de cartílago (Canalis, 2005).

Según Shalhoub y col. los glucocorticoides también tienen ciertos efectos sobre la expresión de genes osteoblásticos, como la disminución de la expresión de colágeno tipo I y de osteocalcina, y una sobreexpresión de la colagenasa intersticial (Shalhoub et al., 1992). Muchas investigaciones sobre el mecanismo por el que los glucocorticoides modulan la expresión de genes de células óseas podrán contribuir a entender la biología de hormonas esteroideas y podrán proporcionar las bases para el diseño de tratamientos efectivos para la osteoporosis inducida por glucocorticoides (Delany et al., 1994).

Además, la síntesis y actividad de los factores de crecimiento de los osteoblastos también puede ser modulada por los glucocorticoides (Canalis, 1996). Se ha descrito que estos fármacos disminuyen la expresión de IGF-I, un importante estimulador de la función de osteoblastos así como la actividad del TGF- β (Chang et al., 1998).

Así pues, la acción de los glucocorticoides sobre los osteoblastos puede ser directa, mediante la activación o represión de la expresión de genes de osteoblastos, o indirecta, mediante la alteración de la expresión o actividad de factores de crecimiento osteoblásticos.

Se ha descrito también la capacidad de los glucocorticoides de suprimir ciertas características del fenotipo de osteoblastos maduros. Distintos estudios han examinado el impacto de estas sustancias sobre señales intra y extracelulares que pueden ser

importantes en el metabolismo óseo. Por ejemplo, los glucocorticoides disminuyen la estabilidad del RNAm a través del gen *cbfa-1* (Chang et al., 1998) y pueden reducir la actividad de muchas quinasas intracelulares (Engelbrecht et al., 2003). También son capaces de reducir la acción de la hormona paratiroidea sobre los osteoblastos (Rubin & Bilezikian, 2002) mientras que pueden aumentar la generación de proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) (Boden et al., 1997). Pero a pesar de la potencial importancia de todos estos aspectos, el impacto de los glucocorticoides sobre la fisiología ósea no parece estar clara todavía.

De cualquier modo los resultados de los estudios *in vivo* tanto en animales como en humanos son inconsistentes; elevadas dosis o dosis a largo plazo de glucocorticoides causan una rápida reabsorción ósea que tiene como resultado una disminución de la masa mineral ósea (Fujita et al., 2000; Villareal, Klaustermeier, Hahn, & Gordon, 1996), mientras que otros estudios en animales de experimentación demuestran que en contraste con lo encontrado en humanos, el tratamiento con glucocorticoides incrementa la masa ósea en ratas, lo cual puede estar más relacionado con la supresión de la resorción ósea que con el aumento de la formación de hueso (King, Weir, Gundersen, Fox, & Insogna, 1996; Turner, Hannon, Greene, & Bell, 1995; Okazaki et al., 1998). De cualquier modo, las comparaciones de los resultados de todos estos estudios son complicadas debido a que utilizan distintas dosis de antiinflamatorio, la duración del tratamiento y forma de administración también difieren así como las características de los animales utilizados, lo que puede ser la causa de las discrepancias entre ellos.

II. OBJETIVOS

Dado que los estudios sobre el papel identificativo de los marcadores antigénicos para los osteoblastos se han realizado sobre cultivos primarios de osteoblastos humanos, es posible que existiera un efecto modulador sobre la expresión antigénica de los factores hormonales y/o factores de crecimiento presentes en el suero bovino fetal utilizado para el cultivo de estas células. Por ello, utilizaremos cortes de tejido óseo para el estudio de la expresión de marcadores antigénicos en la población de osteoblastos humanos en cultivo.

A nuestro juicio son muchas las lagunas que quedan en la literatura en relación a la evaluación de la regeneración ósea que se produce con y sin aplicar el concentrado plaquetario. Otra de las carencias que encontramos es la ausencia de datos sobre el mecanismo de acción del plasma autólogo sobre los osteoblastos tanto a nivel celular como molecular, aspecto este que consideramos de vital importancia, dado que estas células son las responsables de la reparación ósea.

Los antiinflamatorios son fármacos utilizados frecuentemente en la práctica clínica odontológica. Los antecedentes bibliográficos nos llevan a pensar que los antiinflamatorios pueden ejercer efectos sobre distintos parámetros celulares implicados en los procesos de reparación y regeneración ósea, tan necesarios es la mayoría de las intervenciones de rehabilitación orofacial.

Con objeto de aportar nuevos datos en relación tanto al perfil antigénico de los osteoblastos humanos como del efecto de distintas sustancias de uso clínico en odontología sobre esta misma población celular, nos proponemos los siguientes objetivos:

1. Determinar la expresión de marcadores antigénicos previamente descritos en osteoblastos en cultivo, en células frescas, usando para ello cortes de tejido óseo.
2. Estudiar el efecto del PRP sobre diferentes marcadores celulares.
3. Valorar el efecto de antiinflamatorios comúnmente utilizados en el tratamiento odontológico sobre distintos parámetros celulares.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES ANTIGÉNICOS EN CÉLULAS FRESCAS

1.1. Muestras de tejido

El análisis se realizó sobre 10 muestras de tejido óseo humano obtenidas en el desarrollo de cirugía mandibular de 5 mujeres y 5 hombres, voluntarios sanos, con edades comprendidas entre 20 y 30 años, que acudieron a la facultad de Odontología de la Universidad de Granada.

Las secciones de tejido se lavaron meticulosamente en PBS (Phosphate Buffered Saline: tampón salino de fosfatos) a pH 7.4 (Sigma, St Louis, MO, USA) para eliminar la medula y restos de tejido.

Las muestras de tejido óseo se fijaron en formol y fueron incluidas en parafina para su posterior estudio.

1.2. Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales utilizados para el estudio del perfil antigénico se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Anticuerpos monoclonales utilizados para el estudio fenotípico de células frescas

Abmo	Especificidad	Clon	Casa comercial*
OKBcALLA	CD10	NL1-7-6-14-10	OD
CD54	CD54	MEN-III	Ca
CD80	CD80	Alfa-CD80	PM
OKDR	HLA-DR	SC-2	OD
Anti-human alkaline phosphatase	AP	8B6	SI
Anti-human IFN γ	IFN γ	B-B1	DC
Anti-human IL-12	IL-12	B-P24	DC
Anti-human IL-15	IL-15	B-E29	DC

* OD: Ortho Diagnostic System, Raritan, NJ; Ca: Caltag, San Diego, CD; PM: Pharmigen, San Diego, CA; SI: Sigma Aldrich, St. Louis, USA; DC: Daclone, Burlingame cedex, France.

1.3. Inmunohistoquímica

Se utilizó el método del complejo avidina-biotina para determinar la expresión antigénica. En todos los casos, las secciones de tejido óseo, previamente incluidas en parafina, se cortaron en porciones con un espesor de 5 μm con un microtomo (Reichert-Jung 2030. Biocut Rotary Microtome. Orlando, Florida, United States). Posteriormente se montaron en portaobjetos de cristal previamente tratados para inmunohistoquímica (Microscope Slides Precleaned. Fisher Scientific. Pittsburg, USA)

Las muestras desparafinadas en xileno, se rehidrataron por inmersión en una batería con concentraciones decrecientes de etanol (etanol absoluto, 96°, 90°, 70°, 50° y H₂O). Posteriormente las secciones se incubaron con peróxido de hidrógeno al 0.3% en metanol durante 30 minutos con objeto de inhibir la actividad de la peroxidasa endógena.

Trascurrido el tiempo de incubación, las muestras se lavaron en PBS y se incubaron nuevamente con suero humano del grupo AB con objeto de reducir las uniones inespecíficas.

Las muestras así preparadas se incubaron durante toda la noche a 4°C, con diluciones 1:100 de anticuerpos monoclonales (primer anticuerpo, ver tabla 1). Después de tres lavados, las secciones se incubaron con un anticuerpo antiIg biotinilado (segundo anticuerpo) diluido 1:100 en 1% de PBS-sero albúmina bovina durante una hora. Las secciones posteriormente se expusieron al complejo avidina-biotina peroxidasa durante una hora.

Finalmente las muestras se aclararon tres veces en PBS y se revelaron con 0.5 mg/ml de diaminobencidina que contenía 0.01% de peróxido de hidrógeno (Master Diagnostica S.A., Granada. España). La reacción fue contrastada con hematoxilina de Mayer.

Las distintas preparaciones fueron finalmente observadas en un microscopio óptico (Microscopio Binocular URA TECHNIC, Navarra, España). La lectura se realizó

por observación, con el objetivo 100X, valorando el grado de intensidad con los siguientes criterios: - negativo, ± débil y variable, + moderado, ++ fuerte.

2. ESTUDIO DEL EFECTO DEL PRP SOBRE DIFERENTES MARCADORES CELULARES

2.1. Obtención de tejido óseo

Los osteoblastos fueron obtenidos de tejido óseo humano, procedente de osteotomías realizadas durante el curso de intervenciones quirúrgicas. Se obtuvieron un total de 28 muestras de hueso procedentes de 14 pacientes voluntarios sanos (dos muestras por paciente), 8 mujeres y 6 varones, de tercer y cuarto curso de odontología, que acudieron a la clínica de esta facultad para realizarse la extracción de terceros molares inferiores retenidos.

Las muestras se mantuvieron en suero salino isotónico a 4°C desde su recogida hasta su cultivo, durante un tiempo no superior a 4 horas.

2.2. Obtención del Plasma Rico en Plaquetas

Previa firma del consentimiento informado y antes de comenzar la cirugía, los pacientes se sometían a la extracción de 20 cm³ de sangre que posteriormente se distribuyó en 4 tubos con citrato sódico al 3,8% como anticoagulante.

Para la obtención del PRP se siguió el método descrito por el doctor Anitua (Anitua, 1999).

La sangre extraída en las condiciones indicadas se centrifugó a una velocidad de 280 G durante 7 minutos a temperatura ambiente (centrífuga Modelo P.R.G.F.-GAG Medica-España). Esta centrifugación debe ser suave permitiendo así concentrar las plaquetas en el plasma que se encuentra más próximo a los hematíes. Tras el centrifugado se consigue la separación de la serie roja (en la parte inferior del tubo) y el plasma, por encima, en el que se diferencian 3 porciones, que se iban pipeteando (siempre en condiciones de esterilidad, bajo una campana de flujo laminar) y separando al tiempo, desde arriba hacia abajo: plasma pobre en factores de crecimiento (0,5 cm³), plasma con un número de plaquetas similar al de la sangre periférica (0,5 cm³) y plasma

rico en factores de crecimiento o PRP, los 0,5 cm³ justo por encima de la serie roja, y que será la fracción que usaremos para nuestro estudio.

Las 4 fracciones obtenidas de PRP (una por bote de sangre recogido) fueron utilizadas para suplementar el medio de cultivo en donde se depositaron las muestras de hueso obtenidas del mismo paciente durante la cirugía, con objeto de aislar y establecer el cultivo primario de osteoblastos.

2.3. Aislamiento y cultivo de osteoblastos

En el laboratorio, los explantes de tejido óseo se cortaron en piezas de aproximadamente 3 mm² y se eliminaron los restos de periostio y tejidos blandos. A continuación se lavaron en abundante PBS para eliminar todos los elementos sanguíneos contaminantes. Una vez limpio el fragmento de tejido óseo es colocado en un frasco de cultivo de 25 cm² de superficie (Falcom, Labware, Oxford, UK), con 10 ml de medio de cultivo. El medio utilizado es el DMEM (Gibco, Cell Culture Products, Carlsbad, CA), suplementado con 100 UI/ml de penicilina (Lab Roger S.A., Barcelona, España), 50 µg/ml de gentamicina (Braun Medical S.A., Jaén, España), 2.5 µg/ml de anfotericina B (Sigma, St Louis, MO, USA), L-Glutamina al 1% (Sigma, St Louis, MO, USA), HEPES al 2% (Sigma, St Louis, MO, USA) y un 20% de suero bovino fetal (SBF) (Gibco, Paisley, UK) que, previamente, había sido descomplementado en un baño a 56°C, durante 30 minutos. Estas son las condiciones normales de cultivo (grupo control) bajo las que se colocó la primera muestra de cada paciente. La segunda (grupo problema), era cultivada con el mismo medio DMEM, suplementado de igual forma que para el grupo control con la diferencia de que el SBF era sustituido por un 10% de Plasma Rico en Plaquetas que previamente habíamos obtenido de ese mismo paciente.

Ambas muestras se mantuvieron a 37°C en una estufa de CO₂ al 5% y el medio se reemplazaba por decantación cada 6 días.

Se controló periódicamente por microscopía valorando la proliferación de grupo caso y del problema, hasta conseguir las líneas celulares que permitieran su posterior

estudio (Reyes-Botella et al., 2000). Dichas líneas celulares se mantuvieron por subcultivo en su medio correspondiente.

2.4. Preparación de las células osteoblásticas para su estudio

Los osteoblastos cultivados, según el procedimiento anteriormente descrito, proliferan adherido a la superficie del frasco de cultivo, por lo que, para cualquier ensayo o manipulación es necesario despegarlos previamente. Para ello se usa una solución de Tripsina-EDTA (Sigma, St. Louis, MO) durante 10 minutos, a 37°C. Una vez transcurrido ese tiempo, la actividad enzimática es neutralizada con medio DMEN suplementado al 10% con suero bovino fetal. La suspensión celular que se obtiene se centrifuga a 400 G (1200 rpm) y el botón se resuspende en medio de cultivo.

2.4.1. Estudio del efecto del PRP sobre la proliferación celular

La proliferación celular fue determinada en base a la captación de Timidina tritiada (H^3 -timidina). Para ello una suspensión de células previamente ajustada a una densidad celular de 1×10^4 en su medio de cultivo correspondiente, control con suero bovino fetal y de estudio con PRP, se dispuso en volúmenes de 200 μ l en una placa de 96 pocillos. Las placas fueron incubadas durante 24 horas a 37°C en atmósfera de CO_2 al 5%.

Transcurridas las 24 horas se añadió a cada pocillo 0.1 μ Ci/ml de H^3 -timidina (Dupon NEN product, Bosto 3 H-timidina MA, USA), incubándose de nuevo en las mismas condiciones. A las 18 horas las células fueron despegadas con Tripsina-EDTA y neutralizado posteriormente el enzima con medio de cultivo con suero o con PRP, para posteriormente ser recogidas sobre discos de papel de filtro (Whatman), utilizándose para ello un recogedor celular semiautomático (Titertek Cell Harvester, Skatron, Noruega).

Tras su secado, los discos de papel de filtro correspondientes a cada pocillo se colocaron en tubos individuales, a cada uno de los cuales se le añadieron 3 ml de líquido de centelleo (LKB, Wallac, England). Posteriormente se determinó la radiactividad en

un contador de centelleo (BETAmatic Kontron Analytical, Münchenstein, Suiza). La proliferación de los osteoblastos se calculó determinándose la incorporación de H³-timidina por la célula en proliferación. Los resultados se expresaron en dpm (número de desintegraciones por minuto).

2.4.2. Estudio del efecto del PRP sobre la expresión antigénica

El análisis antigénico de los osteoblastos humanos obtenidos por cultivo con suero bovino fetal o con PRP como suplemento al medio se realizó utilizando una batería de anticuerpos monoclonales (Abmo, ver tabla 4) marcados con distintos fluorocromos y la técnica de citometría de flujo. Para ello se obtuvo una suspensión celular como se indica en el apartado II.4. de este material y método y se ajustó a 5×10^5 células/ml. 100 µl de dicha suspensión celular se incubaron con 10 ó 20 µl del Abmo correspondiente a investigar y se incubó durante 20 minutos a 4°C en oscuridad. Transcurrido el periodo de incubación se lavó con PBS y se analizó el porcentaje y la intensidad de fluorescencia con un citrómetro de flujo (Fasc Vantage Becton Dickinson, Palo Alto, California, USA). En todos los casos se incluyó un control negativo.

Los resultados se expresaron como porcentaje de células positivas para el marcador analizado, junto a la intensidad de fluorescencia detectada lo que nos sugiere la densidad de expresión del mismo.

Tabla 4. Anticuerpos monoclonales utilizados para el estudio fenotípico

Abmo	CD/especialidad	Fluorocromo	Casa comercial
OKM13	CD13	PE	Ortho DS, (Bélgica)
CD44	CD44	FITC	Sigma Immunochemicals, (USA)
CD54	CD54	FITC	Caltag, (EE.UU.)
CD68	CD68	FITC	Dako (Denmark)
CD80	CD80	FITC	Pharmingen, (EE.UU.)
CD86	CD86	FITC	Pharmingen, (EE.UU.)
OKDR	HLA-DR	FITC	Ortho DS, (Bélgica)
Anti-fosfatasa alcalina	AP	FITC	Cymbus Biotechnology (USA)

2.4.3. Estudio del efecto del PRP sobre el ciclo celular

El estudio del efecto del PRP sobre el ciclo celular de los osteoblastos humanos en cultivo se realizó partiendo de una suspensión celular, obtenida según se indica en el apartado II.4 de este material y método y siguiendo la metodología descrita por Ormerod (Ormerod, 2000). A 200 μ l de una suspensión de células en PBS ajustada a 5×10^5 células/ml se le añadieron 2 ml de etanol al 70% en agua destilada helada y se agitó vigorosamente dejándolo en reposo al menos durante 30 minutos en frío. Se lavaron las células por centrifugación y se suspendieron en 800 μ l de PBS. Las células se analizaron microscópicamente con objeto de eliminar los posibles grumos, en cuyo caso se utilizó una jeringa de insulina. A continuación se adicionaron 100 μ l de RNasa (1mg/ml) y 100 μ l de Ioduro de Propidio y se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente se analizaron en un citómetro de flujo con un láser de argón a 488 nm (Fasc Vantage Becton Dickinson, Palo Alto, California, USA).

3. EFECTO DE LOS ANTIINFLAMATORIOS COMÚNMENTE UTILIZADOS EN EL TRATAMIENTO ODONTOLÓGICO SOBRE DISTINTOS PARÁMETROS CELULARES

Para este estudio se seleccionaron tres antiinflamatorios, escogidos fundamentalmente por su utilidad clínica en la práctica odontológica, dos de ellos son AINES: Ibuprofeno (Sigma Chem. Comp., St Louis, Mo, USA) y Paracetamol (Sigma Chem. Comp., St Louis, Mo, USA) y el último es un antiinflamatorio esteroideo: Metilprednisolona (Sanofi-Aventis, España). Con dichos antiinflamatorios hemos tratado, *in vitro*, líneas celulares de osteoblastos humanos en cultivo con objeto de determinar su efecto sobre distintos parámetros celulares.

3.1. Efecto de los antiinflamatorios sobre la proliferación celular

El efecto sobre la capacidad proliferativa de los osteoblastos humanos en cultivo se realizó mediante el recuento del número de células tras el tratamiento con distintas concentraciones de antiinflamatorio durante 24 y 48 horas, utilizando como contador de células un citómetro de flujo Ortho Cyturon Absolute (Ortho Diagnostic System, Raritan, USA).

Las células suspendidas en medio de cultivo sin SBF y ajustadas a una concentración final de 2×10^5 células/ml, se dispusieron en una placa de cultivo de 24 pocillos (Falcon, Becton Dickinson Labware, N.J., USA), conteniendo cada uno de ellos un volumen de 2 ml. Cada pocillo fue tratado con la dosis correspondiente de antiinflamatorio a estudiar: 5 y 25 μM para Ibuprofeno y el Paracetamol, y 10^{-6} y 10^{-8} M para la Metilprednisolona.

En todas las experiencias se incluyeron pocillos sin tratamiento como controles. Todos los ensayos se realizaron por cuadruplicado.

Las placas de cultivo fueron posteriormente incubadas a 37°C durante 24 o 48 horas. Una vez transcurrido el periodo de incubación, las células se despegaron con 1ml de una solución de Tripsina-EDTA durante 10 minutos a 37°C . Posteriormente se neutralizó la actividad enzimática con otro mililitro de medio DMEM suplementado con

un 10% con SBF. La suspensión celular obtenida se depositó en un frasco universal y se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos. El botón celular obtenido se suspendió en 500 µl de PBS, se agitó y se procedió al recuento del número total de células en un citómetro de flujo. Los datos se expresaron como el número de células totales/ml.

3.2. Efecto de los antiinflamatorios sobre el perfil antigénico

Para determinar el efecto de los distintos antiinflamatorios estudiados sobre la expresión antigénica de cultivos primarios de osteoblastos humanos, las células se cultivaron durante 24 horas con las siguientes dosis: 5 y 25 µM de Ibuprofeno y Paracetamol y 10^{-6} y 10^{-8} M de Metilprednisolona.

Se obtuvo una suspensión celular tras tratar los cultivos con Tripsina-EDTA, neutralizar con medio DMEM suplementado al 20% y lavar por centrifugado durante 10 minutos a 1200 rpm.

Se incubaron 100 µl de la suspensión celular con 10 µl del Abmo correspondiente (ver tabla 5), durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Transcurrido este periodo con el Abmo, las células se lavaron por centrifugación con PBS y el sedimento se suspendió en 1 ml de PBS para su lectura en un citómetro de flujo (FACS Vantage SE, Becton Dickinson, Paloalto, California, USA). En todos los ensayos se incluyeron controles de isotipo, con objeto de descartar los falsos positivos por unión inespecífica.

Tabla 5. Anticuerpos monoclonales utilizados para el estudio del efecto de antiinflamatorios sobre el perfil fenotípico de osteoblastos humanos en cultivo

Abmo	CD/especialidad	Fluorocromo	Casa comercial
OKB-cALLa	CD10	PE	Ortho DS, (Bélgica)
OKM13	CD13	FITC	Ortho DS, (Bélgica)
OKB	CD21	PE	Ortho DS, (Bélgica)
CD44	CD44	FITC	Sigma Immunochemicals, (USA)
CD54	CD54	FITC	Caltag, (EE.UU.)
CD80	CD80	FITC	Pharmingen, (EE.UU.)
CD86	CD86	FITC	Pharmingen, (EE.UU.)
OKDR	HLA-DR	FITC	Ortho DS, (Bélgica)

3.3. Efecto de los antiinflamatorios sobre el ciclo celular

Para determinar el efecto de los distintos antiinflamatorios sobre el ciclo celular de osteoblastos humanos, las células se cultivaron a 37°C, en atmósfera de CO₂ al 5%, con las siguientes dosis de antiinflamatorios: 5 y 25 µM de Ibuprofeno y Paracetamol y 10⁻⁶ y 10⁻⁸ M de Metilprednisolona, durante un periodo de 24 horas. Transcurrido ese tiempo se obtuvieron distintas suspensiones celulares (una por dosis de antiinflamatorio más un grupo control, sin tratamiento) tras tratar con tripsina-EDTA, neutralizar con medio DMEM suplementado al 20% y lavar por centrifugado durante 10 minutos a 1200 rpm.

La técnica utilizada para el estudio del ciclo celular fue la descrita por Ormerod (Ormerod, 2000) y que se detalla en el apartado II. 4. 3 de este material y métodos.

3.4. Efecto de los antiinflamatorios sobre la capacidad fagocítica

La capacidad fagocítica de las líneas celulares de osteoblastos humanos fue estudiada siguiendo una técnica citométrica y confirmada posteriormente mediante microscopía electrónica de transmisión.

Para la técnica de citometría de flujo se utilizaron como partículas diana bolitas de látex de 2 µm de diámetro marcadas con fluoresceína (Sigma Chem. Comp., St Louis, Mo, USA).

Previamente las células fueron cultivadas durante 24 horas a 37°C, en atmósfera de CO₂ al 5%, con distintas concentraciones de antiinflamatorios: 5 y 25 µM de Ibuprofeno y Paracetamol y 10⁻⁶ y 10⁻⁸ M de Metilprednisolona.

Trascurridas las 24 horas, dos mililitros de una suspensión celular en medio DMEM suplementado con un 10% de SBF y una densidad celular media de 1x10⁴ células/ml, se incubaron con 10 µl de una suspensión de las bolitas marcadas con fluoresceína, a 37°C durante 30 minutos en oscuridad. Posteriormente, las células fueron lavadas y suspendidas en 1 ml de PBS, e inmediatamente después analizadas en un citómetro de flujo (FACS Vantage SE, Becton Dickinson, Paloalto, California,

USA).

Los resultados se expresaron como el porcentaje de células que fluorescen o células fagocitadas.

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todas las experiencias realizadas para la consecución de cada uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral, se repitieron al menos tres veces.

Los datos recogidos fueron tratados y analizados mediante el programa informático SPSS versión 13.0 (Statistical Program for Social Science) para el entorno Windows XP.

Como todas las variables de interés fueron variables continuas (proliferación celular, porcentaje de expresión, intensidad de fluorescencia media), los resultados se expresaron como media \pm desviación típica.

Las diferencias estadísticas entre los distintos grupos estudiados (control y diferentes tratamientos) se evaluaron con el test T-Student, considerando significativos valores de $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS

1. EXPRESIÓN DE MARCADORES ANTIGÉNICOS EN CÉLULAS FRESCAS

Los osteoblastos humanos han sido las células objeto de nuestro estudio. Para el análisis de la expresión de marcadores antigénicos sobre células frescas se utilizaron diez cortes de tejido óseo de voluntarios sanos, sometidos a cirugía mandibular. Cinco pertenecían a mujeres y los otros cinco a hombres, de edades comprendidas entre los 20 y los 30 años.

Los osteoblastos fueron identificados por su morfología y su localización.

El patrón de reactividad fue similar en todas las muestras analizadas. La mayoría de los osteoblastos mostraron una intensa positividad frente a los antígenos CD10, CD44 y fosfatasa alcalina (Tabla 6). La expresión de CD54, CD80 y HLA-DR presentó más variabilidad. El CD54 fue moderadamente positivo en tres muestras y su expresión fue muy débil en una de ellas; la expresión de CD80 y HLA-DR fue débil en dos de las muestras analizadas y ausente en el resto (tabla 6).

Todos los cortes de tejido mostraron una expresión positiva frente a IFN- γ , mientras que la expresión de citoquinas como IL-12 e IL-15 fue variable (Tabla. 6).

Tabla 6. Reactividad de los antígenos frente a células osteoblásticas en cortes de tejido óseo

mAb	Grado de intensidad*	% de células positivas
CD10	++	90-100
CD44	+	90-100
CD54	±	20-40
CD80	-/+	10-20
HLA-DR	-/+	10-20
AP	+	90-100
IFN- γ	++	90-100
IL-12	+	90-100
IL-15	+	90-100

*El grado de intensidad se estimó como sigue a continuación: - negativo, ± débil y variable, + moderado, ++ fuerte

2. EFECTO DEL PRP SOBRE DIFERENTES MARCADORES CELULARES

2.1. Aislamiento, cultivo y caracterización de los osteoblastos humanos

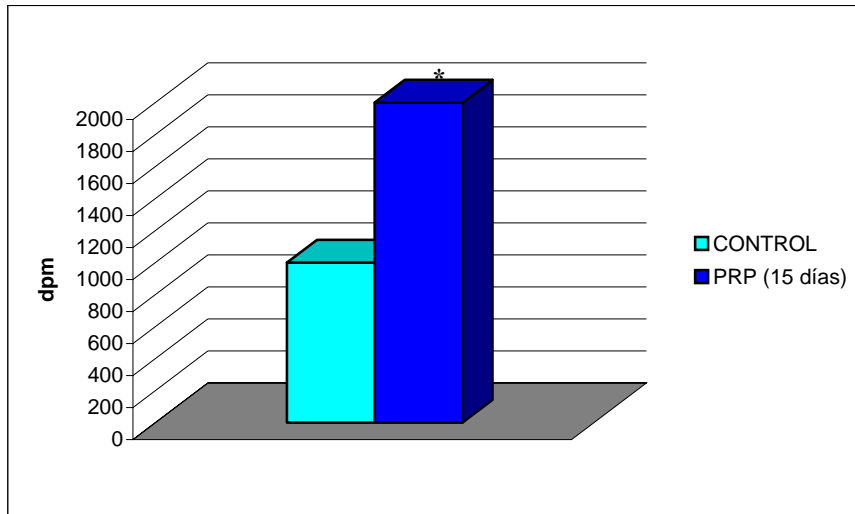
Para su aislamiento partimos de muestras de tejido cortical de un total de 14 pacientes voluntarios sanos, de ambos sexos (6 varones y 8 mujeres), con edades comprendidas entre los 20 y 23 años (21,1 años de edad media), que eran sometidos a la extracción de terceros molares retenidos. En todos los casos se recogieron 2 muestras de tejido óseo por paciente las cuales se cultivaron separadamente, una en medio suplementado con suero bovino fetal y otra en medio suplementado con PRP, hasta obtener un crecimiento semiconfluyente de células. En el primer caso, el tiempo medio necesario para alcanzar la semiconfluencia fue de unos 15 a 20 días, a diferencia del cultivo con PRP, que requirió un tiempo medio de unos 7 a 10 días. Los cultivos así obtenidos, en ambos casos, se mantuvieron por subcultivo en sus medios correspondientes, pero no de manera indefinida, por lo que transcurrido un cierto tiempo, las líneas celulares empiezan a mostrar signos de agotamiento; muestra de ello es la pérdida de la capacidad proliferativa y alteraciones morfológicas típicas. Cabe señalar, que el periodo de tiempo en el que las células se mantuvieron por subcultivo sin mostrar signos de agotamiento fue inferior significativamente en el caso de utilizar como suplemento el PRP (aproximadamente unos 30 a 40 días) con respecto a las células cultivadas con suero bovino fetal (aproximadamente 80 a 90 días).

Las distintas líneas celulares obtenidas, en cada caso, fueron identificadas por su morfología, características bioquímicas y perfil antigénico.

2.2. Efecto del PRP sobre la proliferación celular

El estudio de la capacidad proliferativa se determinó mediante la técnica de incorporación de Timidina-tritiada. Dicho estudio se realizó a los 15 y a los 30 días de iniciado el cultivo. Como podemos observar en la figura 1, las células obtenidas en presencia de PRP presentan en los 15 días una tasa de crecimiento significativamente mayor (que las células cultivadas con suero bovino fetal (control)). A los 30 días sin embargo la célula disminuye su capacidad proliferativa mientras que en las células control se mantiene (figura 2). Podemos resumir que el PRP aumenta de forma

significativa la proliferación de los osteoblastos humanos en cultivo durante las primeras semanas, si bien se observó un envejecimiento prematuro de los cultivos con PRP, en relación, a los controles.



* $p < 0.001$

Figura 1. Medida de la proliferación de los osteoblastos humanos en cultivo con PRP durante 15 días con respecto del control (cultivos con suero bovino fetal al 20%), mediante la captación de H^3 -tritiada, expresado en dpm (número de desintegraciones por minuto).

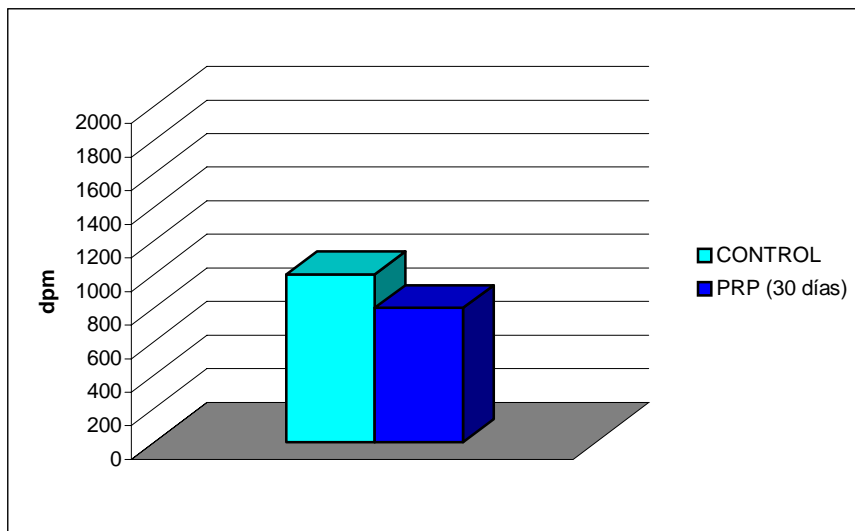


Figura 2. Medida de la proliferación de los osteoblastos humanos en cultivo con PRP durante 30 días con respecto del control (cultivos con suero bovino fetal al 20%), mediante la captación de H^3 -tritiada, expresado en dpm (número de desintegraciones por minuto).

2.3. Efecto del PRP sobre la expresión antigénica

El efecto del PRP como suplemento o factor de crecimiento sobre la expresión de marcadores de superficie de los osteoblastos humanos en cultivo se determinó mediante el uso de una batería de Abmo y la técnica de citometría de flujo. Los marcadores seleccionados para este estudio fueron, los que se expresan en el 100% de la población (CD10, CD13, CD44 y Fosfatas alcalina) y los que se expresan en parte de ella (CD54, CD69, CD80, CD86 y HLA-DR) según los antecedentes bibliográficos. Los resultados obtenidos quedan recogidos en la tabla 7.

Tabla 7. Expresión antigénica de los osteoblastos humanos en cultivo, obtenidos en medios con suero bovino fetal (control) y en medios con PRP, utilizando para ello una batería de Abmo y la técnica de citometría de flujo.

<i>Marcador</i>	Control			PRP		
	%Expresión mínima	%Expresión máxima	%Expresión media	%Expresión mínima	%Expresión máxima	%Expresión media
CD10	98,70	99,80	99,50	87,32	99,70	97,90
CD13	99,60	99,90	99,85	90,80	99,85	99,00
CD44	98,60	99,30	99,00	87,46	99,38	98,70
CD54	15,78	22,50	19,78	49,10	90,78	65,58
CD69	45,45	55,40	51,45	53,96	78,78	68,27
CD80	20,11	35,60	22,11	36,36	85,89	63,27
CD86	51,39	64,50	61,39	57,11	88,53	79,19
HLA-DR	13,38	19,30	15,38	71,98	91,60	75,65
AP	99,90	100,00	99,98	90,68	98,98	95,99

2.3.1. Expresión de los antígenos CD10 y CD13

Las endopeptidasas de superficie caracterizadas como CD10 y CD13 son expresadas prácticamente en el 100% de las distintas líneas analizadas no observándose efecto como consecuencia del uso del PRP a nivel del porcentaje de positividad. Si cabe señalar un incremento de la intensidad de fluorescencia (IF) en las células obtenidas por cultivo con PRP. Así el CD10 pasa de valores de IF del orden de 104,16 de los controles a 182,70 de las tratadas con PRP. En la figura 3 se muestran los histogramas de fluorescencia obtenidos para el CD13 en las dos condiciones de cultivo.

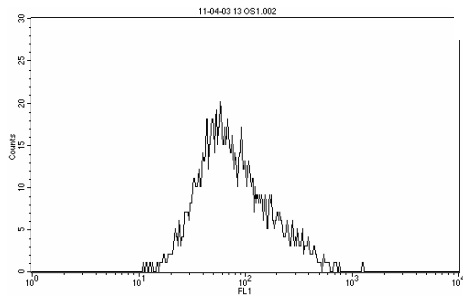


Fig. 3.a) Histograma de fluorescencia obtenido mediante citometría de flujo para el antígeno CD13: cultivo de osteoblastos humanos en medio suplementado con SBF (grupo control).

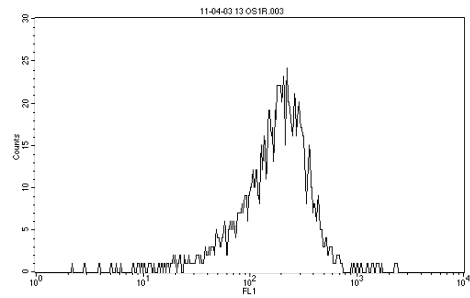


Fig. 3.b) Histograma de fluorescencia obtenido mediante citometría de flujo para el antígeno CD13: cultivo de osteoblastos humanos en medio suplementado con PRP (grupo problema).

2.3.2. Expresión del antígeno CD44

El antígeno CD44 es una molécula de adhesión funcional. Es el receptor del ácido hialurónico. A dicha molécula se le atribuyen dos funciones importantes: participar en el reclutamiento de leucocitos a los tejidos y actuar como molécula coestimuladora de los linfocitos T. Dicha molécula se expresó en la totalidad de la población analizada, independientemente de las condiciones de cultivo, como podemos observar tanto en la tabla 7 como en la figura 4.

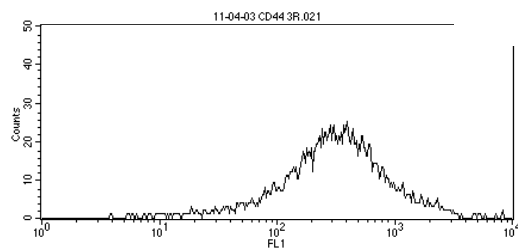


Fig. 4.a) Histograma de fluorescencia obtenido mediante citometría de flujo para el antígeno CD44: cultivo de osteoblastos humanos en medio suplementado con SBF (grupo control).

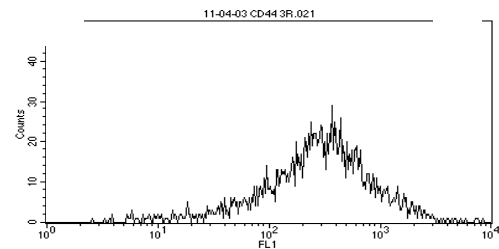


Fig. 4.b) Histograma de fluorescencia obtenido mediante citometría de flujo para el antígeno CD44: cultivo de osteoblastos humanos en medio suplementado con PRP (grupo problema).

2.3.3. Expresión del antígeno CD54

Entre las funciones descritas para el CD54 cabe señalar su participación en los procesos de presentación del antígeno. Esta molécula se expresó en un porcentaje reducido de osteoblastos en cultivo, sin embargo, cuando la línea celular se establece

utilizando PRP se observa un incremento significativo del porcentaje de células positivas para dicho marcador (figura 5). Igualmente, en estas condiciones de cultivo se produce un incremento en la intensidad de fluorescencia (de 19,78 a 276,14).

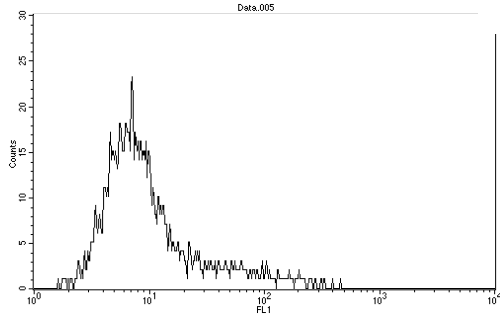


Fig. 5.a) Histograma de fluorescencia obtenido mediante citometría de flujo para el antígeno CD54: cultivo de osteoblastos humanos en medio suplementado con SBF (grupo control).

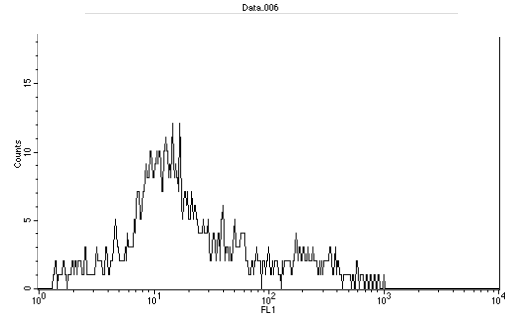


Fig. 5.b) Histograma de fluorescencia obtenido mediante citometría de flujo para el antígeno CD54: cultivo de osteoblastos humanos en medio suplementado con PRP (grupo problema).

2.3.4. Expresión del antígeno CD69

La expresión de esta molécula es signo de activación celular. Como podemos observar en la tabla 7 y en la figura 6 la expresión celular de esta molécula aumenta ligeramente en las células obtenidas en presencia de PRP.

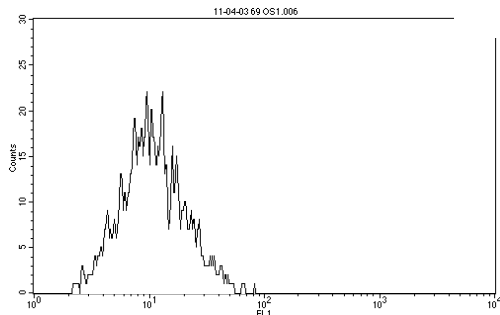


Fig. 6.a) Histograma de fluorescencia obtenido mediante citometría de flujo para el antígeno CD69: cultivo de osteoblastos humanos en medio suplementado con SBF (grupo control).

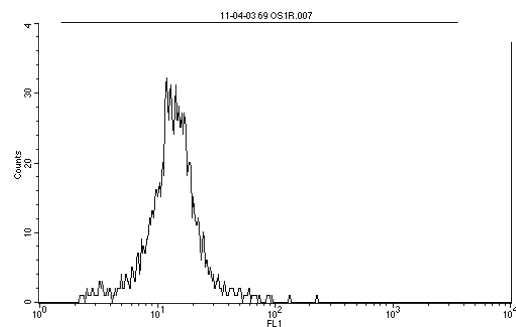


Fig. 6.b) Histograma de fluorescencia obtenido mediante citometría de flujo para el antígeno CD69: cultivo de osteoblastos humanos en medio suplementado con PRP (grupo problema).

2.3.5. Expresión del antígeno CD80 y CD86

Ambos antígenos, CD80 y CD86 son moléculas coestimuladoras de los linfocitos T y su expresión es característica de las células presentadoras de antígeno.

Tanto CD80 como CD86 se expresaron en una subpoblación de las líneas celulares establecidas, y como podemos observar el cultivo en presencia de PRP aumentó de forma significativa ambos antígenos. Cabe destacar la dispersión de resultados obtenidos cuando el antígeno analizado fue el CD80 en los cultivos con PRP (tabla 7 y figura 7).

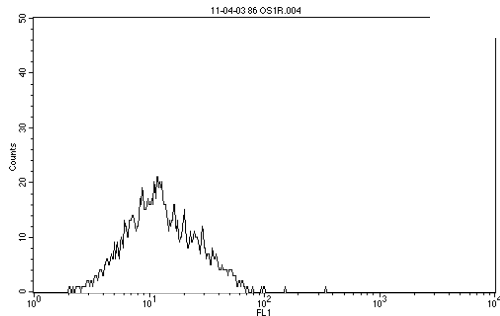


Fig. 7.a) Histograma de fluorescencia obtenido mediante citometría de flujo para el antígeno CD86: a) Cultivo de osteoblastos humanos en medio suplementado con SBF (grupo control).

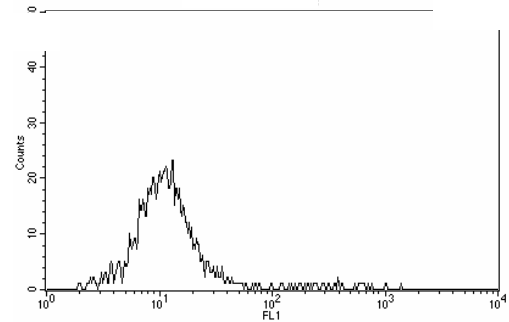


Fig. 7.b) Histograma de fluorescencia obtenido mediante citometría de flujo para el antígeno CD86: cultivo de osteoblastos humanos en medio suplementado con PRP (grupo problema).

2.3.6. Expresión de HLA-DR

El antígeno de clase II HLA-DR, que codifica el Complejo Principal de Histocompatibilidad, participa de forma activa en el proceso de presentación del antígeno. Dicha molécula presente en una parte minoritaria de la población aumentó de forma llamativa cuando la población analizada fueron los osteoblastos obtenidos en cultivos suplementados con PRP (tabla 7 y figura 8).

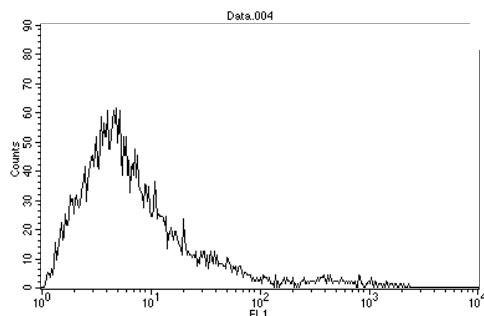


Fig. 8.a) Histograma de fluorescencia obtenido mediante citometría de flujo para el antígeno HLA-DR: cultivo de osteoblastos humanos en medio suplementado con SBF (grupo control).

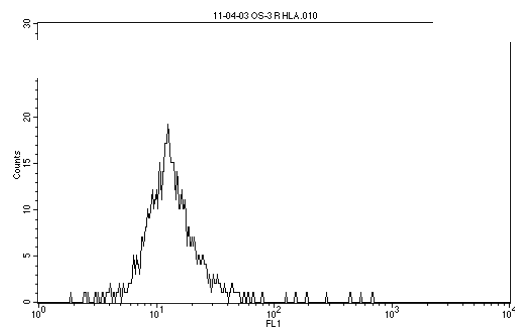


Fig. 8.b) Histograma de fluorescencia obtenido mediante citometría de flujo para el antígeno HLA-DR: cultivo de osteoblastos humanos en medio suplementado con PRP (grupo problema).

2.3.7. Expresión del Fosfatasa Alcalina

La fosfatasa alcalina es un enzima característico de los osteoblastos y se utiliza como marcador del metabolismo óseo. Esta molécula es propia de los osteoblastos maduros. No se ha observado efecto como consecuencia del uso del PRP a nivel del porcentaje de positividad (tabla 7 y figura 9).

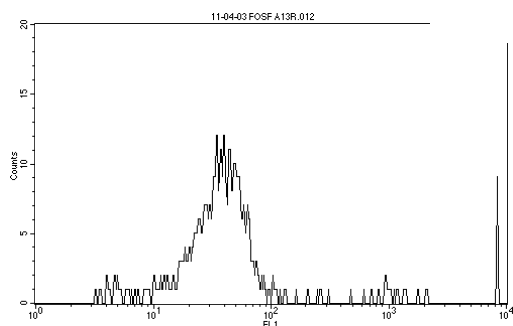


Fig. 9.a) Histograma de fluorescencia obtenido mediante citometría de flujo para el antígeno Fosfatasa alcalina: cultivo de osteoblastos humanos en medio suplementado con SBF (grupo control).

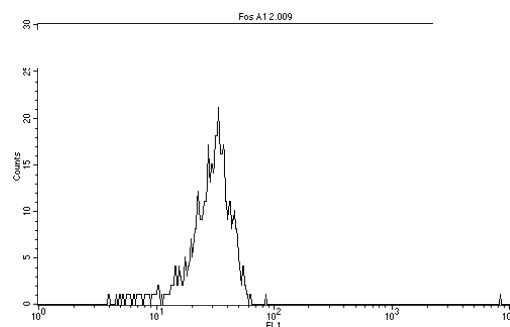


Fig. 9.b) Histograma de fluorescencia obtenido mediante citometría de flujo para el antígeno Fosfatasa alcalina: cultivo de osteoblastos humanos en medio suplementado con PRP (grupo problema).

2.4. Efecto del PRP sobre el ciclo celular

Las células en cultivo tras su fijación, eliminación del RNA y tinción con Ioduro de Propidio se analizaron por citometría de flujo con un programa adecuado para valorar su ciclo celular. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 8 y en la figura 10. El estudio de los datos muestra que las células presentes en los cultivos con PRP no presentaron alteraciones importantes con respecto del control o células cultivadas en presencia de suero bovino fetal. Dado que mostraron un ciclo celular propio de células normales, no observándose la presencia de aneuploidia del DNA. El término de aneuploidia de DNA es utilizado para hacer referencia a todas las alteraciones cuantitativas del DNA. Ya que las células transformadas muestran una cantidad de DNA diferente al que se detecta en células normales diploides en la misma fase del ciclo celular.

Los datos obtenidos descartan la posible diferenciación anómala de éstas células como consecuencia del tratamiento con PRP, no detectándose por lo tanto signos de transformación neoplásica.

Tabla 8. Análisis del ciclo celular de los osteoblastos humanos en cultivo con suero bovino fetal y e presencia de PRP. Porcentaje de células en los diferentes estadios

FASES	PORCENTAJE CELULAR	
	CONTROL	PRP
G0-G1	89,46% a 65,85%	97,60% a 66,77%
G2-M	9,40% a 132,27%	2,33% a 141,62%
S	1,15%	0,06%
%CV	12,38%	11,71%

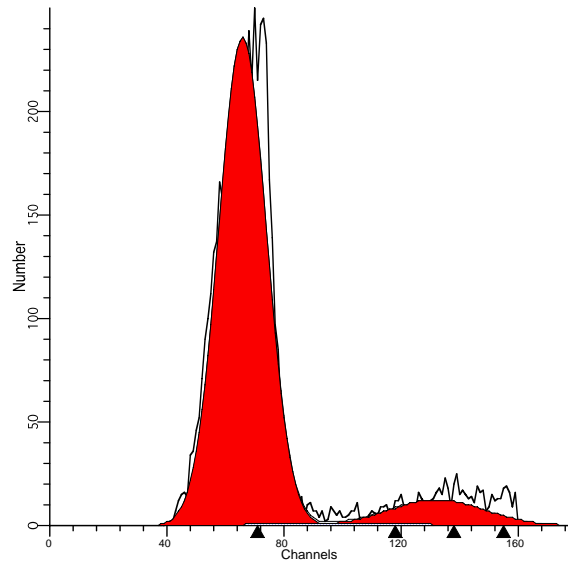


Fig. 10.a) Perfil de fluorescencia del ciclo celular de los osteoblastos humanos en cultivo: control

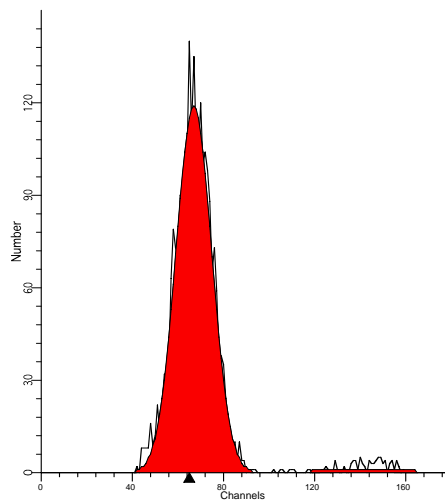


Fig. 10.b) Perfil de fluorescencia del ciclo celular de los osteoblastos humanos en cultivo: PRP

3. EFECTO DE LOS ANTIINFLAMATORIOS COMÚNMENTE UTILIZADOS EN EL TRATAMIENTO ODONTOLÓGICO SOBRE DISTINTOS PARÁMETROS CELULARES

3.1. Efecto de los antiinflamatorios sobre la proliferación celular

Para valorar el efecto de los antiinflamatorios sobre la proliferación de osteoblastos humanos en cultivo las células se trataron con distintas dosis de antiinflamatorios estudiados y se analizaron a las 24 y 48 horas tras el tratamiento.

3.1.1. Efecto del Ibuprofeno sobre la proliferación de osteoblastos humanos

A las 24 horas de tratamiento con ibuprofeno se observó una disminución de la proliferación celular en los cultivos tratados con concentraciones de 5 μ M y 25 μ M del antiinflamatorio comparadas con los controles ($p=0.001$, $p=0.002$ respectivamente) como se puede observar en la tabla 9 y figura 11.

A las 48 horas se observó un descenso de la proliferación celular en los cultivos tratados con las dos concentraciones de Ibuprofeno aunque los resultados no fueron estadísticamente significativos (tabla 9 y figura 12).

Tabla 9. Efecto del Ibuprofeno sobre la proliferación de osteoblastos humanos en cultivo tras 24 y 48 horas de incubación.

	Tratamiento	Media	d.t.*	Valor p	IC**(95%)
24 horas	Control	16,53	6,07	1	1
	Ibuprofeno 25 μ M	11,08	4,01	0,001	2,45-8,44
	Ibuprofeno 5 μ M	11,55	4,37	0,002	1,90-8,05
48 horas	Control	19,10	8,97	1	1
	Ibuprofeno 25 μ M	14,57	8,75	0,072	-,416-9,48
	Ibuprofeno 5 μ M	15,05	8,69	0,138	-1,35- 9,46

*desviación típica; ** Intervalo de Confianza

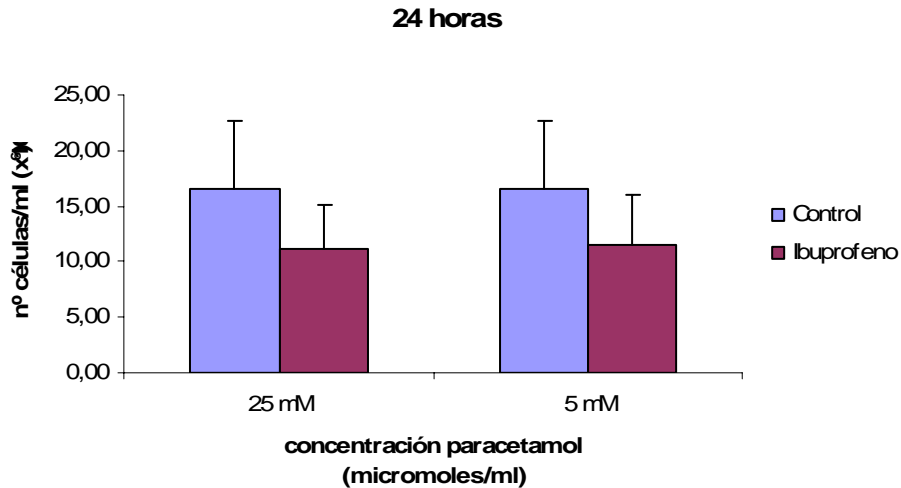


Figura 11. Efecto del Ibuprofeno sobre la proliferación de osteoblastos humanos en cultivo tras 24 horas de incubación. * $p=0.001$; ** $p=0.002$

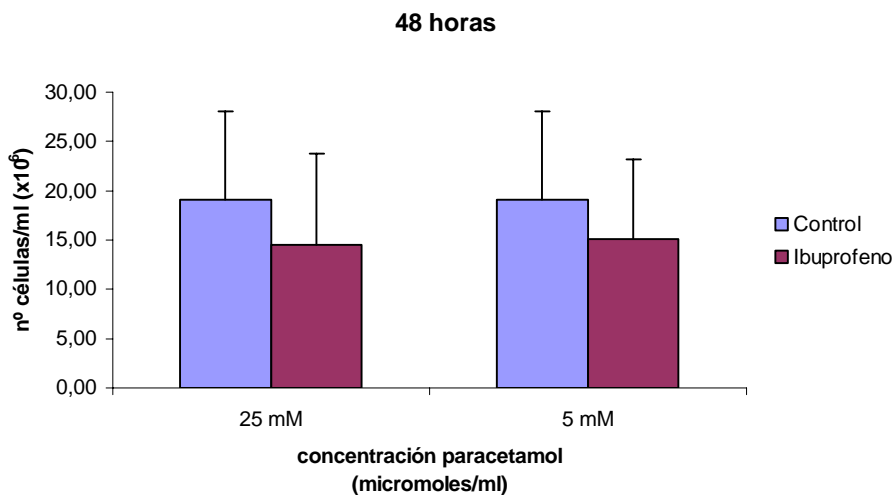


Figura 12. Efecto del Ibuprofeno sobre la proliferación de osteoblastos humanos en cultivo tras 48 horas de incubación.

3.1.2. Efecto del Paracetamol sobre la proliferación de osteoblastos humanos

Los resultados obtenidos, como se observa en la Figura 13, mostraron que tras 24 horas de tratamiento se produjo una disminución de la proliferación celular en los cultivos tratados con concentraciones de 5 μ M y 25 μ M de paracetamol comparadas con los controles ($p=0.005$, $p=0.0001$, respectivamente) (tabla 10 y figura 13). Los resultados no fueron significativos tras 48 horas de tratamiento (tabla 10 y figura 14).

Tabla 10. Efecto del Paracetamol sobre la proliferación de osteoblastos humanos en cultivo tras 24 y 48 horas de incubación.

	Tratamiento	Media	d.t.	Valor p	IC
24 horas	Control	16,53	6,07	1	1
	Paracetamol 25µM	12,78	4,98	0,02	0,52-6,97
	Paracetamol 5µM	11,13	4,79	0,00	2,21-8,57
48 horas	Control	19,10	8,97	1	1
	Paracetamol 25µM	15,40	9,29	0,168	-1,60-9,00
	Paracetamol 5µM	14,37	9,23	0,078	-0,56-10,01

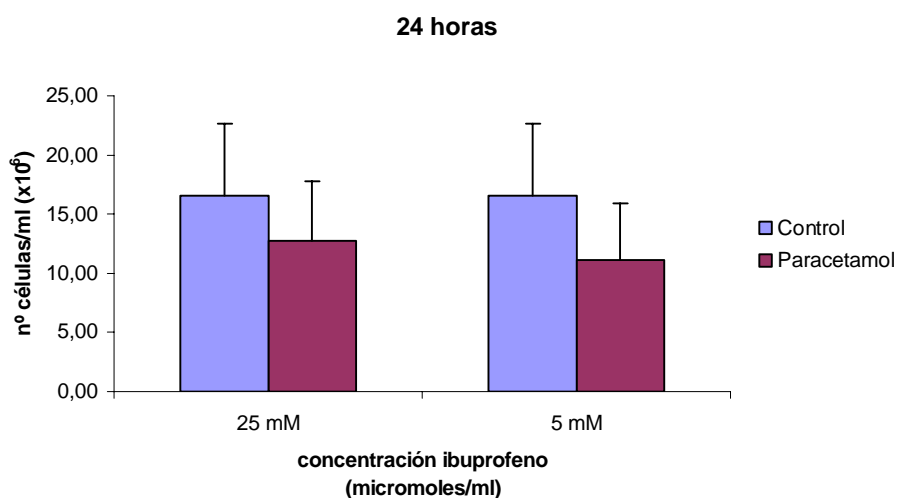


Figura 13. Efecto del Paracetamol sobre la proliferación de osteoblastos humanos en cultivo tras 24 horas de incubación. *p=0.02 **p=0.00

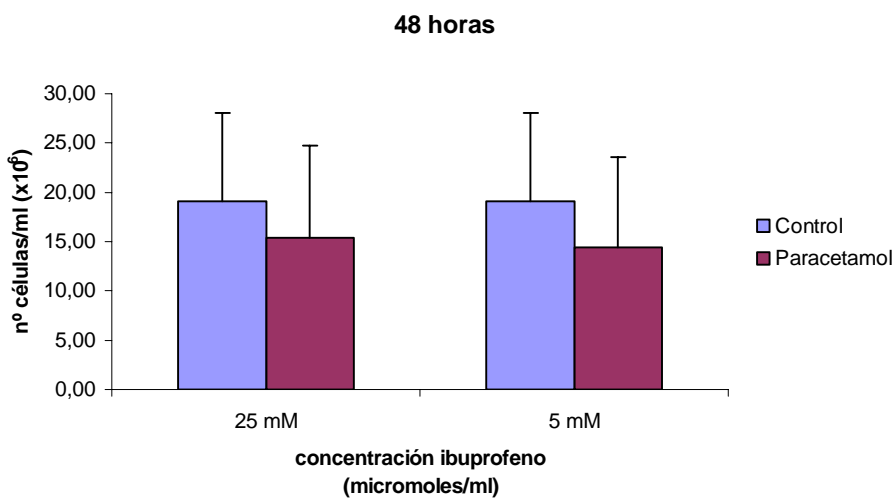


Figura 14. Efecto del Paracetamol sobre la proliferación de osteoblastos humanos en cultivo tras 48 horas de incubación.

3.1.3. Efecto de la Metilprednisolona sobre la proliferación de osteoblastos humanos

Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento con 10^{-6} y 10^{-8} M de metilprednisolona producen un descenso significativo de la proliferación tras 48 horas de incubación con respecto de las células no tratadas, con valores de $p < 0,000$ en ambos casos (tabla 11 y figura 16). Sin embargo a las 24 horas sólo se observó un descenso significativo de la proliferación celular en el grupo tratado con el antiinflamatorio a dosis de 10^{-8} M ($p < 0,01$) (tabla 11 y figura 15)

Tabla 11. Efecto de la Metilprednisolona sobre la proliferación de osteoblastos humanos en cultivo tras 24 y 48 horas de incubación.

	Tratamiento	Media	d.t.	Valor p	IC
24 horas	Control	8,79	4,87	1	1
	Metilprednisolona 10^{-6} M	6,89	4,56	0,17	-,849-4,64
	Metilprednisolona 10^{-8} M	5,41	3,91	0,01	0,80-5,94
48 horas	Control	7,45	2,52	1	1
	Metilprednisolona 10^{-6} M	4,82	2,23	,000	1,25-4,01
	Metilprednisolona 10^{-8} M	3,89	2,16	,000	2,19-4,92

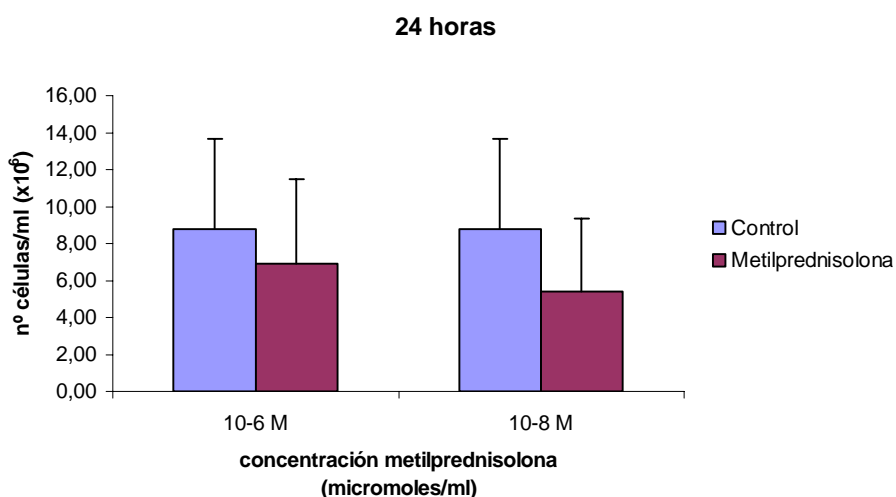


Figura 15. Efecto de la Metilprednisolona sobre la proliferación de osteoblastos humanos en cultivo tras 24 horas de incubación. * $p=0.01$

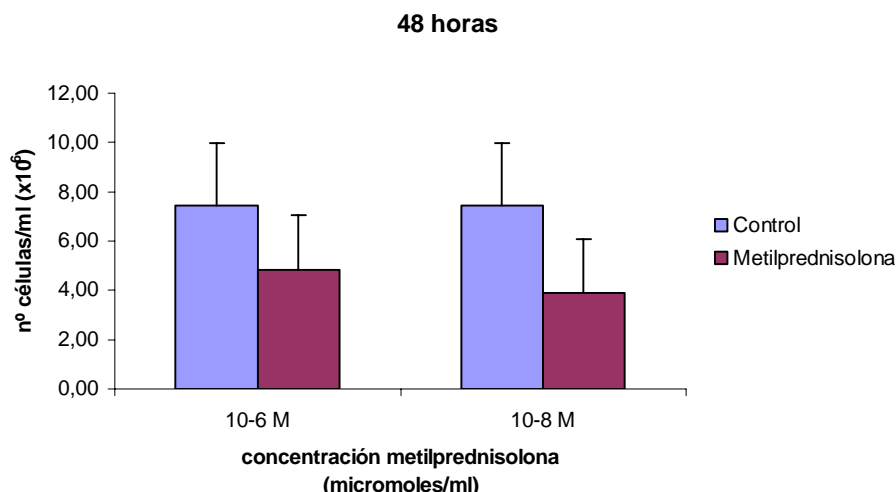


Figura 16. Efecto de la Metilprednisolona sobre la proliferación de osteoblastos humanos en cultivo tras 48 horas de incubación. *p<0.000 **p<0.000

3.2. Modulación del perfil antigénico de los osteoblastos humanos en cultivo por la acción de diferentes antiinflamatorios

Nuestro estudio se ha centrado en analizar el efecto de distintos antiinflamatorios sobre la expresión de marcadores presentes en la membrana celular de los osteoblastos humanos en cultivo. Entre los marcadores antigénicos seleccionados se encuentran, aquellos que son detectados prácticamente en el 100% de los osteoblastos en cultivo (CD10, CD13, CD21 y CD44), y los relacionados con la función de activación y/o presentación antigénica (CD54, CD80, CD86 y HLA-DR). Estos marcadores han sido seleccionados en base a investigaciones anteriores.

Con respecto a los antiinflamatorios utilizados en el estudio cabe señalar que el tiempo de tratamiento ha sido 24 horas puesto que los cultivos en presencia del antiinflamatorio durante dicho tiempo se mostraron más efectivos en cuanto a la proliferación celular. Las dosis seleccionadas para cada antiinflamatorio han sido las mismas que para el estudio de la proliferación: 5 y 25 μM para el Paracetamol e Ibuprofeno y 10^{-6} y 10^{-8} M para la Metilprednisolona.

3.2.1. Efecto del tratamiento con Ibuprofeno sobre la expresión antigénica

Tras el tratamiento con distintas dosis de Ibuprofeno (5 y 25 μM) no se observó ningún cambio en el porcentaje de expresión ni en la intensidad de fluorescencia, a nivel de los antígenos CD10, CD13, CD21 y CD44 (tablas 12-15 y figura 17 y 18).

Tampoco se observaron cambios en la expresión de antígenos implicados en la presentación antigénica como el CD54, CD80, CD86 y HLA-DR, para ambas dosis estudiadas (tablas 16-19 y figura 17 y 18).

Tabla 12. Expresión del antígeno CD10 en cultivos primarios de osteoblastos humanos tratados con dos dosis de Ibuprofeno (5 μM y 25 μM) mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan en % de expresión e intensidad de fluorescencia media (IMF).

CD10						
Tratamiento	% de expresión	d.t.*	Valor p / IC** (95%)	IMF	d.t.*	Valor p / IC (95%)
Control	78,71	16,90	1	91,48	42,90	1
Ibuprofeno 5 μM	69,62	21,42	0,50 [-21,51-39,71]	91,24	68,56	0,99 [-85,96-86,44]
Ibuprofeno 25 μM	69,14	22,14	0,48 [-21,44-40,59]	88,34	78,91	0,93 [-89,86-96,15]

*desviación típica; ** Intervalo de confianza

Tabla 13. Expresión del antígeno CD13 en cultivos primarios de osteoblastos humanos tratados con dos dosis de Ibuprofeno (5 μM y 25 μM) mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan en % de expresión e intensidad de fluorescencia media (IMF).

CD13						
Tratamiento	% de expresión	d.t.*	Valor p / IC** (95%)	IMF	d.t.	Valor p / IC (95%)
Control	84,71	4,54	1	283,12	83,98	1
Ibuprofeno 5 μM	78,59	12,01	0,28 [-6,39-18,63]	339,48	53,49	0,33 [-184,30-71,59]
Ibuprofeno 25 μM	82,28	6,64	0,53 [-6,31-11,18]	231,35	188,07	057 [-153,98-257,53]

*desviación típica; ** Intervalo de confianza

Tabla 14. Expresión del antígeno CD21 en cultivos primarios de osteoblastos humanos tratados con dos dosis de Ibuprofeno (5 μ M y 25 μ M) mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan en % de expresión e intensidad de fluorescencia media (IMF).

CD21						
Tratamiento	% de expresión	d.t.*	Valor p / IC** (95%)	IMF	d.t.	Valor p / IC (95%)
Control	94,38	2,68	1	227,09	46,77	1
Ibuprofeno 5 μ M	87,14	10,13	0,12 [-2,58-17,05]	144,50	62,32	0,05 [-3,84-169,02]
Ibuprofeno 25 μ M	92,29	3,93	0,37 [-3,08-7,26]	154,03	75,32	0,11 [-21,28-167,39]

*desviación típica; ** Intervalo de confianza

Tabla 15. Expresión del antígeno CD44 en cultivos primarios de osteoblastos humanos tratados con dos dosis de Ibuprofeno (5 μ M y 25 μ M) mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan en % de expresión e intensidad de fluorescencia media (IMF).

CD44						
Tratamiento	% de expresión	d.t.*	Valor p / IC** (95%)	IMF	d.t.	Valor p / IC (95%)
Control	88,27	6,54	1	1703,74	240,02	1
Ibuprofeno 5 μ M	90,13	4,90	0,682 [-12,08-8,38]	1738,05	246,90	0,84 [-438,95-370,34]
Ibuprofeno 25 μ M	93,04	0,98	0,26 [-14,05-4,52]	1733,44	251,24	0,86 [-436,48-377,09]

*desviación típica; ** Intervalo de confianza

Tabla 16. Expresión del antígeno CD54 en cultivos primarios de osteoblastos humanos tratados con dos dosis de Ibuprofeno (5 μ M y 25 μ M) mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan en % de expresión e intensidad de fluorescencia media (IMF).

CD54						
Tratamiento	% de expresión	d.t.*	Valor p / IC** (95%)	IMF	d.t.	Valor p / IC(95%)
Control	30,41	9,71	1	102,32	34,99	1
Ibuprofeno 5 μ M	32,29	7,02	0,77 [-16,97-13,21]	110,31	28,48	0,74 [-63,61-47,62]
Ibuprofeno 25 μ M	37,36	3,09	0,27 [-20,94-7,05]	98,98	33,20	0,89 [-54,33-61,00]

*desviación típica; ** Intervalo de confianza

Tabla 17. Expresión del antígeno CD80 en cultivos primarios de osteoblastos humanos tratados con dos dosis de Ibuprofeno (5 μ M y 25 μ M) mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan en % de expresión e intensidad de fluorescencia media (IMF).

CD80						
Tratamiento	% de expresión	d.t.*	Valor p / IC** (95%)	IMF	d.t.	Valor p / IC (95%)
Control	21,97	10,77	1	99,85	34,93	1
Ibuprofeno 5 μ M	26,47	5,10	0,52 [-20,39-11,40]	103,03	30,51	0,89 [-59,58-53,21]
Ibuprofeno 25 μ M	21,47	9,67	0,94 [-17,01-18,01]	96,14	38,99	0,88 [-56,72-64,13]

*desviación típica; ** Intervalo de confianza.

Tabla 18. Expresión del antígeno CD86 en cultivos primarios de osteoblastos humanos tratados con dos dosis de Ibuprofeno (5 μ M y 25 μ M) mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan en % de expresión e intensidad de fluorescencia media (IMF).

CD86						
Tratamiento	% de expresión	d.t.*	Valor p / IC** (95%)	IMF	d.t.	Valor p / IC (95%)
Control	20,81	10,69	1	96,39	37,84	1
Ibuprofeno 5 μ M	19,84	5,60	0,88 [-14,94-16,89]	134,62	61,66	0,27 [-115,02-38,56]
Ibuprofeno 25 μ M	15,74	8,00	0,49 [-11,65-21,78]	114,18	40,59	0,53 [-82,41-46,82]

*desviación típica; ** Intervalo de confianza

Tabla 19. Expresión del antígeno HLA-DR en cultivos primarios de osteoblastos humanos tratados con dos dosis de Ibuprofeno (5 μ M y 25 μ M) mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan en % de expresión e intensidad de fluorescencia media (IMF).

HLA-DR						
Tratamiento	% de expresión	d.t.*	Valor p / IC** (95%)	IMF	d.t.	Valor p / IC (95%)
Control	23,78	14,40	1	103,80	37,99	1
Ibuprofeno 5 μ M	25,62	3,37	0,83 [-22,40-18,73]	103,73	30,29	0,99 [-60,06-60,20]
Ibuprofeno 25 μ M	36,77	33,26	0,42 [-49,02-23,04]	108,77	35,77	0,85 [-67,46-57,52]

*desviación típica; ** Intervalo de confianza

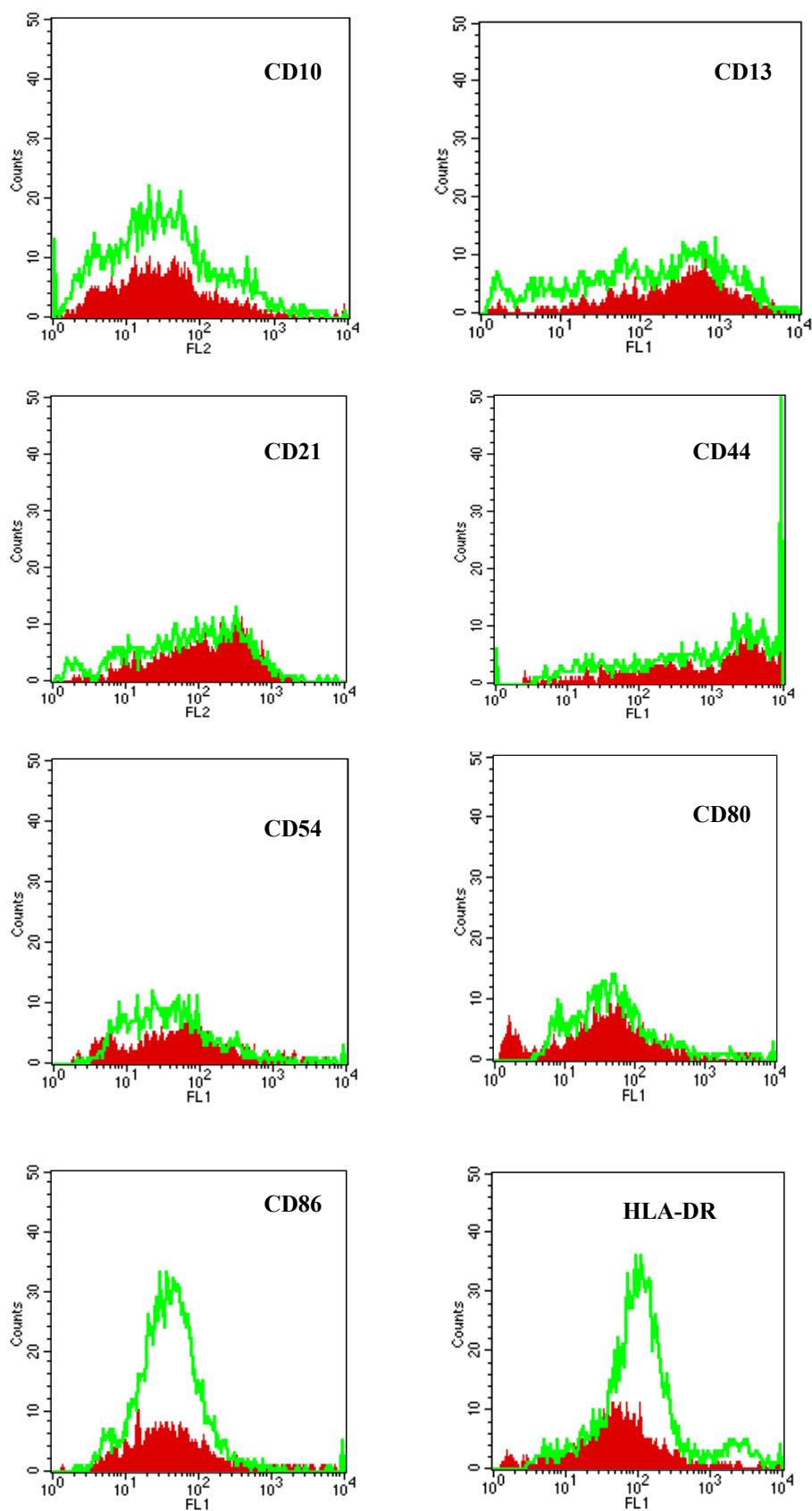


Figura 17. Histograma de fluorescencia obtenido mediante citometría de flujo para los distintos antígenos estudiados, en cultivos de osteoblastos humanos tratados con dosis de Ibuprofeno 5 μ M (verde) comparados con un grupo control, sin tratamiento (rojo)

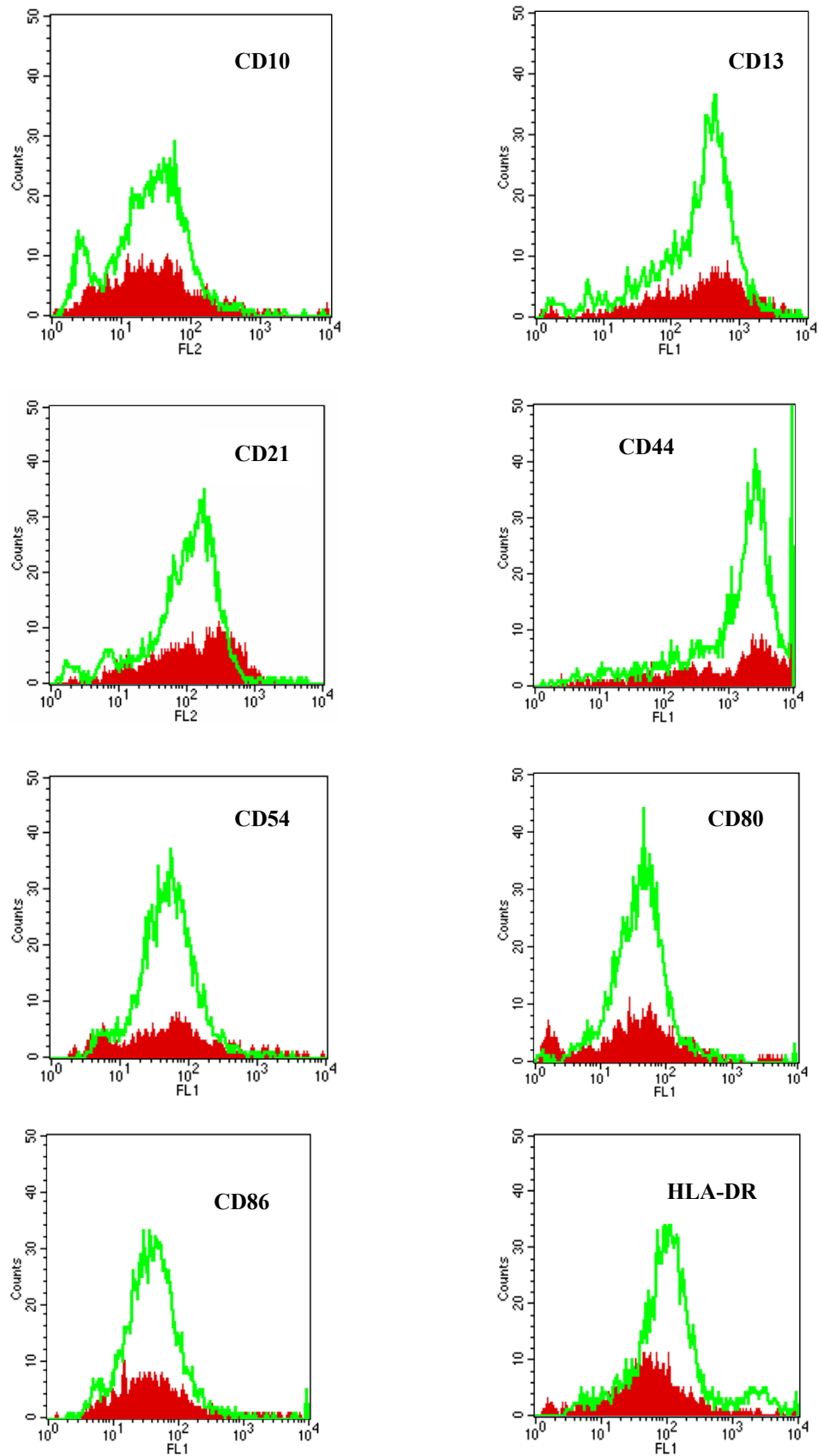


Figura 18. Histograma de fluorescencia obtenido mediante citometría de flujo para los distintos antígenos estudiados, en cultivos de osteoblastos humanos tratados con dosis de Ibuprofeno 25 μM (verde) comparados con un grupo control, sin tratamiento (rojo).

3.2.2. Efecto del tratamiento con Paracetamol sobre la expresión antigénica

Como podemos observar en las tablas...y figuras..., el tratamiento con las dos dosis de Paracetamol estudiadas, en general no produjo cambios significativos en la expresión de antígenos considerados constitutivos (CD10, CD13, CD21 y CD44) así como en los antígenos implicados en la presentación antigénica (CD54, CD80, CD86 y HLA-DR) en comparación con las células sin tratamiento.

Tabla 20. Expresión del antígeno CD10 en cultivos primarios de osteoblastos humanos tratados con dos dosis de Paracetamol (5 μ M y 25 μ M) mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan en % de expresión e intensidad de fluorescencia media (IMF).

CD10						
Tratamiento	% de expresión	d.t.*	Valor p / IC** (95%)	IMF	d.t.	Valor p / IC (95%)
Control	78,71	16,90	1	91,48	42,90	1
Paracetamol 5 μ M	91,64	2,43	0,24 [-36,90-11,06]	107,39	13,39	0,56 [-77,71-45,89]
Paracetamol 25 μ M	86,01	6,50	0,50 [-31,87-17,28]	117,71	25,84	0,37 [-91,10-38,65]

*desviación típica; ** Intervalo de confianza

Tabla 21. Expresión del antígeno CD13 en cultivos primarios de osteoblastos humanos tratados con dos dosis de Paracetamol (5 μ M y 25 μ M) mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan en % de expresión e intensidad de fluorescencia media (IMF).

CD13						
Tratamiento	% de expresión	d.t.*	Valor p / IC** (95%)	IMF	d.t.	Valor p / IC (95%)
Control	84,71	4,54	1	283,12	83,98	1
Paracetamol 5 μ M	86,91	5,43	0,53 [-10,26-5,85]	325,18	129,83	0,56 [-208,04-123,92]
Paracetamol 25 μ M	79,46	10,52	0,31 [-6,13-16,64]	290,21	51,67	0,89 [-134,43-120,26]

*desviación típica; ** Intervalo de confianza

Tabla 22. Expresión del antígeno CD21 en cultivos primarios de osteoblastos humanos tratados con dos dosis de Paracetamol (5 μ M y 25 μ M) mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan en % de expresión e intensidad de fluorescencia media (IMF).

CD21						
Tratamiento	% de expresión	d.t.*	Valor p / IC** (95%)	IMF	d.t.	Valor p / IC (95%)
Control	94,38	2,68	1	227,09	46,77	1
Paracetamol 5 μ M	96,79	1,50	0,20 [-6,44-1,61]	271,52	46,84	0,22 [-122,67-33,80]
Paracetamol 25 μ M	94,78	2,73	0,83 [-4,92-4,11]	304,16	70,09	0,08 [-168,13-13,99]

*desviación típica; ** Intervalo de confianza

Tabla 23. Expresión del antígeno CD44 en cultivos primarios de osteoblastos humanos tratados con dos dosis de Paracetamol (5 μ M y 25 μ M) mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan en % de expresión e intensidad de fluorescencia media (IMF).

CD44						
Tratamiento	% de expresión	d.t.*	Valor p / IC** (95%)	IMF	d.t.	Valor p / IC (95%)
Control	88,27	6,54	1	1703,74	240,02	1
Paracetamol 5 μ M	92,77	2,09	0,29 [-13,93-4,94]	1832,89	569,94	0,63 [-741,12-482,84]
Paracetamol 25 μ M	88,16	5,818	0,98 [-10,49-10,72]	1595,07	128,92	0,49 [-249,55-466,90]

*desviación típica; ** Intervalo de confianza

Tabla 24. Expresión del antígeno CD54 en cultivos primarios de osteoblastos humanos tratados con dos dosis de Paracetamol (5 μ M y 25 μ M) mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan en % de expresión e intensidad de fluorescencia media (IMF).

CD54						
Tratamiento	% de expresión	d.t.*	Valor p / IC** (95%)	IMF	d.t.	Valor p / IC (95%)
Control	30,41	9,71	1	102,32	34,99	1
Paracetamol 5 μ M	38,27	11,97	0,32 [-25,26-9,55]	103,89	44,70	0,95 [-65,14-62,00]
Paracetamol 25 μ M	32,40	14,81	0,81 [-21,06-17,08]	102,67	39,84	0,98 [-61,29-60,58]

*desviación típica; ** Intervalo de confianza; *** Intensidad Media de Fluorescencia

Tabla 25. Expresión del antígeno CD80 en cultivos primarios de osteoblastos humanos tratados con dos dosis de Paracetamol (5 μ M y 25 μ M) mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan en % de expresión e intensidad de fluorescencia media (IMF).

CD80						
Tratamiento	% de expresión	d.t.*	Valor p / IC** (95%)	IMF	d.t.	Valor p / IC (95%)
Control	21,97	10,77	1	99,85	34,93	1
Paracetamol 5 μ M	29,23	19,91	0,48 [-30,68-16,16]	103,40	47,45	0,90 [-68,63-61,52]
Paracetamol 25 μ M	24,84	13,38	0,73 [-22,23-16,49]	82,33	32,00	0,95 [-63,67-60,23]

*desviación típica; ** Intervalo de confianza

Tabla 26. Expresión del antígeno CD86 en cultivos primarios de osteoblastos humanos tratados con dos dosis de Paracetamol (5 μ M y 25 μ M) mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan en % de expresión e intensidad de fluorescencia media (IMF).

CD86						
Tratamiento	% de expresión	d.t.*	Valor p / IC** (95%)	IMF	d.t.	Valor p / IC (95%)
Control	20,81	10,69	1	96,39	37,84	1
Paracetamol 5 μ M	27,58	18,42	0,49 [-29,11-15,58]	107,85	55,15	0,72 [-84,18-61,27]
Paracetamol 25 μ M	26,37	15,32	0,54 [-25,95-14,83]	102,69	45,63	0,83 [-73,55-60,94]

*desviación típica; ** Intervalo de confianza

Tabla 27. Expresión del antígeno HLA-DR en cultivos primarios de osteoblastos humanos tratados con dos dosis de Paracetamol (5 μ M y 25 μ M) mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan en % de expresión e intensidad de fluorescencia media (IMF).

HLA-DR						
Tratamiento	% de expresión	d.t.*	Valor p / IC** (95%)	IMF	d.t.	Valor p / IC (95%)
Control	23,78	14,40	1	103,80	37,99	1
Paracetamol 5 μ M	27,52	19,08	0,74 [-30,28-22,81]	99,06	42,86	0,87 [-61,21-70,70]
Paracetamol 25 μ M	22,79	14,91	0,92 [-23,33-25,32]	96,88	37,33	0,80 [-56,29-70,14]

*desviación típica; ** Intervalo de confianza

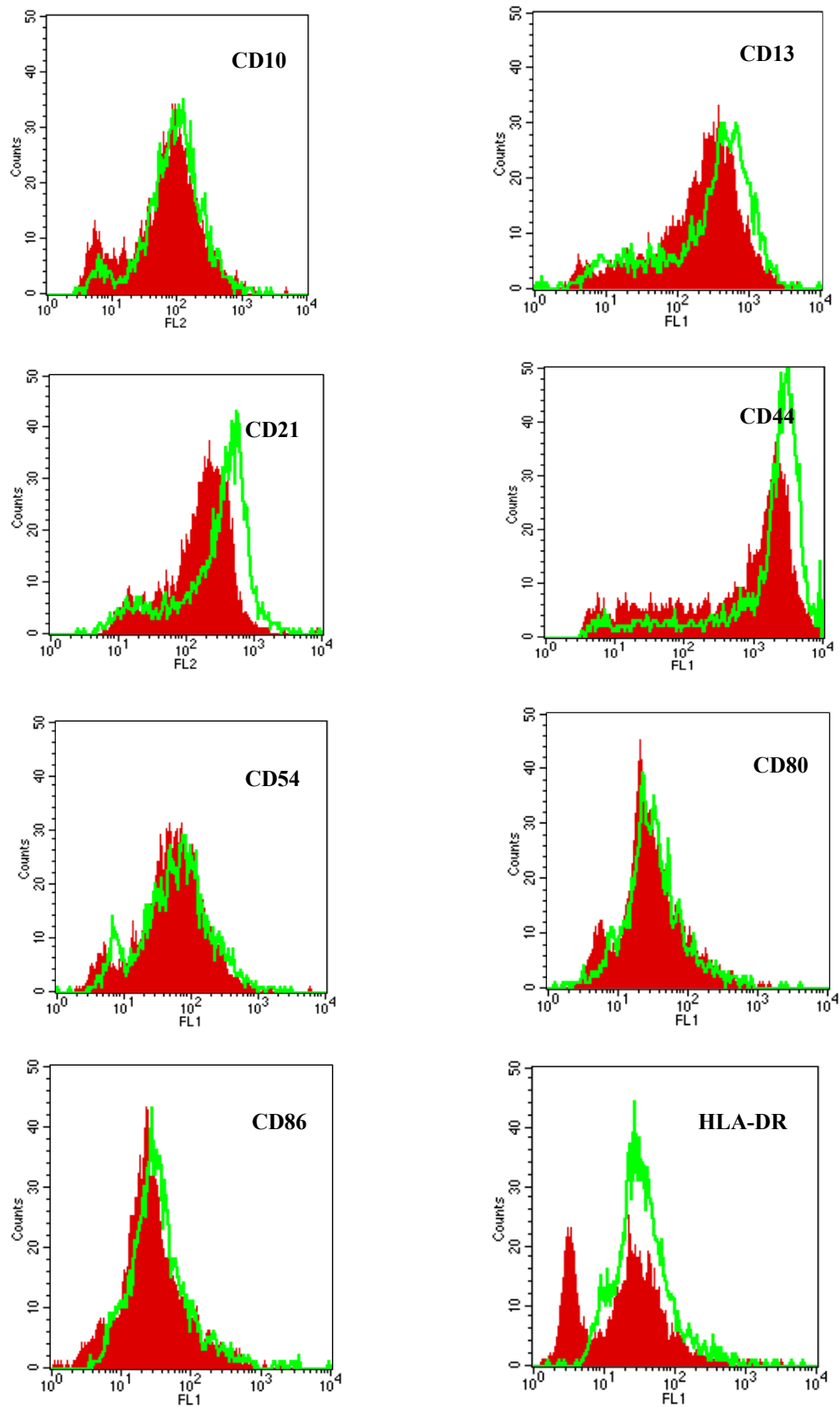


Figura 19. Histograma de fluorescencia obtenido mediante citometría de flujo para los distintos antígenos estudiados, en cultivos de osteoblastos humanos tratados con dosis de Paracetamol 5 μM (verde) comparados con un grupo control, sin tratamiento (rojo).

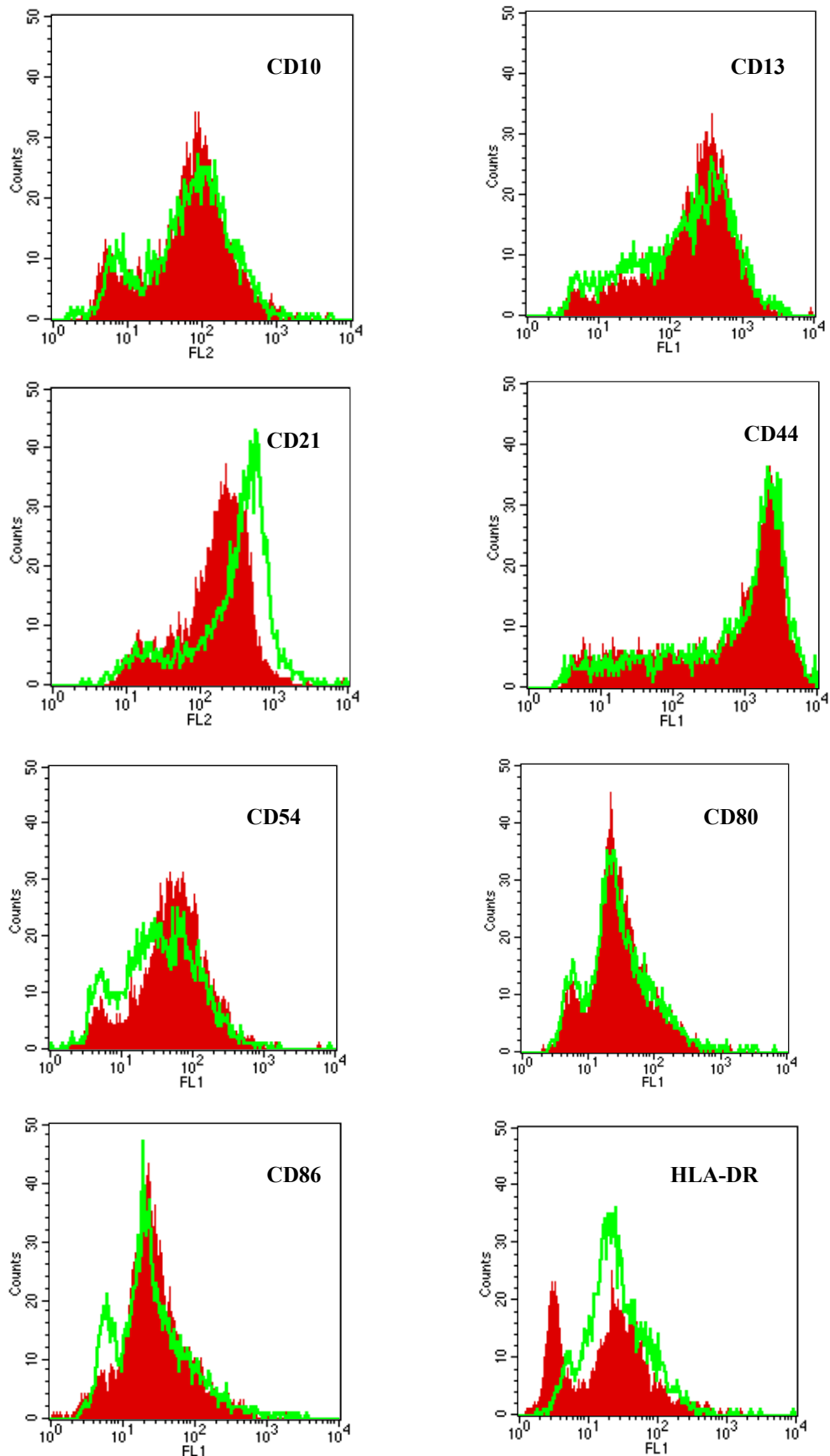


Figura 20. Histograma de fluorescencia obtenido mediante citometría de flujo para los distintos antígenos estudiados, en cultivos de osteoblastos humanos tratados con dosis de Paracetamol 25 μ M (verde) comparados con un grupo control, sin tratamiento (rojo).

3.2.3. Efecto del tratamiento con Metilprednisolona sobre la expresión antigénica

Tras el tratamiento con Metilprednisolona a dosis de 10^{-6} y 10^{-8} M, al igual que en el resto de antiinflamatorios estudiados, no observamos grandes cambios en los valores de porcentaje de expresión e intensidad de fluorescencia media, para todos los antígenos estudiados. En el caso concreto de la Metilprednisolona hay que destacar que si que observamos una tendencia a incrementar la expresión de antígenos implicados en la presentación antigénica, como son el CD54, CD80, CD86 y HLA-DR, aunque esta tendencia no llega a ser estadísticamente significativa (tablas ... y figuras....).

Tabla 28. Expresión del antígeno CD10 en cultivos primarios de osteoblastos humanos tratados con dos dosis de Metilprednisolona (10^{-6} μ M y 10^{-8} μ M) mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan en % de expresión e intensidad de fluorescencia media (IMF).

CD10						
Tratamiento	% de expresión	d.t.*	Valor p / IC** (95%)	IMF	d.t.	Valor p / IC (95%)
Control	78,71	16,90	1	91,48	42,90	1
Metilprednisolona 10^{-6} M	76,15	21,18	0,84 [-27,91-33,04]	130,91	82,83	0,36 [-135,11-56,26]
Metilprednisolona 10^{-8} M	88,53	1,40	0,36 [-33,73-14,10]	108,57	30,04	0,56 [-83,39-49,22]

*desviación típica; ** Intervalo de confianza

Tabla 29. Expresión del antígeno CD13 en cultivos primarios de osteoblastos humanos tratados con dos dosis de Metilprednisolona (10^{-6} μ M y 10^{-8} μ M) mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan en % de expresión e intensidad de fluorescencia media (IMF).

CD13						
Tratamiento	% de expresión	d.t.*	Valor p / IC** (95%)	IMF	d.t.	Valor p / IC (95%)
Control	84,71	4,54	1	283,12	83,98	1
Metilprednisolona 10^{-6} M	81,64	4,94	0,38 [-4,73-10,86]	376,36	50,47	0,12 [-220,20-33,72]
Metilprednisolona 10^{-8} M	81,37	9,00	0,46 [-6,95-13,63]	264,85	33,42	0,73 [-104,10-140,65]

*desviación típica; ** Intervalo de confianza

Tabla 30. Expresión del antígeno CD21 en cultivos primarios de osteoblastos humanos tratados con dos dosis de Metilprednisolona (10^{-6} μ M y 10^{-8} μ M) mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan en % de expresión e intensidad de fluorescencia media (IMF).

CD21						
Tratamiento	% de expresión	d.t.*	Valor p / IC** (95%)	IMF	d.t.	Valor p / IC (95%)
Control	94,38	2,68	1	227,09	46,77	1
Metilprednisolona 10^{-6} M	93,04	4,85	0,60 [-4,42-7,10]	218,12	81,00	0,83 [-89,05-106,99]
Metilprednisolona 10^{-8} M	95,38	0,90	0,56 [-4,90-2,89]	249,53	107,50	0,66 [-139,06-94,18]

*desviación típica; ** Intervalo de confianza

Tabla 31. Expresión del antígeno CD44 en cultivos primarios de osteoblastos humanos tratados con dos dosis de Metilprednisolona (10^{-6} μ M y 10^{-8} μ M) mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan en % de expresión e intensidad de fluorescencia media (IMF).

CD44						
Tratamiento	% de expresión	d.t.*	Valor p / IC** (95%)	IMF	d.t.	Valor p / IC (95%)
Control	88,27	6,54	1	1703,74	240,02	1
Metilprednisolona 10^{-6} M	88,88	5,99	0,89 [-11,29-10,08]	1586,27	350,45	0,56 [-344,21-579,16]
Metilprednisolona 10^{-8} M	89,10	6,02	0,86 [-11,53-9,87]	1842,33	160,87	0,40 [-506,98-229,82]

*desviación típica; ** Intervalo de confianza

Tabla 32. Expresión del antígeno CD54 en cultivos primarios de osteoblastos humanos tratados con dos dosis de Metilprednisolona (10^{-6} μ M y 10^{-8} μ M) mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan en % de expresión e intensidad de fluorescencia media (IMF).

CD54						
Tratamiento	% de expresión	d.t.*	Valor p / IC** (95%)	IMF	d.t.	Valor p / IC (95%)
Control	30,41	9,71	1	102,32	34,99	1
Metilprednisolona 10^{-6} M	36,23	13,07	0,47 [-23,84-12,21]	107,21	42,94	0,85 [-67,49-57,70]
Metilprednisolona 10^{-8} M	38,81	28,09	0,51 [-37,01-20,22]	101,94	31,41	0,98 [-56,48-57,24]

*desviación típica; ** Intervalo de confianza

Tabla 33. Expresión del antígeno CD80 en cultivos primarios de osteoblastos humanos tratados con dos dosis de Metilprednisolona (10^{-6} μ M y 10^{-8} μ M) mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan en % de expresión e intensidad de fluorescencia media (IMF).

CD80						
Tratamiento	% de expresión	d.t.*	Valor p / IC** (95%)	IMF	d.t.	Valor p / IC (95%)
Control	21,97	10,77	1	99,85	34,93	1
Metilprednisolona 10^{-6} M	30,41	7,40	0,26 [-25,04-8,16]	105,04	43,61	0,85 [-68,09-57,71]
Metilprednisolona 10^{-8} M	22,19	12,78	0,97 [-19,26-18,81]	95,02	31,14	0,84 [-51,84-61,50]

*desviación típica; ** Intervalo de confianza

Tabla 34. Expresión del antígeno CD86 en cultivos primarios de osteoblastos humanos tratados con dos dosis de Metilprednisolona (10^{-6} μ M y 10^{-8} μ M) mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan en % de expresión e intensidad de fluorescencia media (IMF).

CD86						
Tratamiento	% de expresión	d.t.*	Valor p / IC** (95%)	IMF	d.t.	Valor p / IC (95%)
Control	20,81	10,69	1	96,39	37,84	1
Metilprednisolona 10^{-6} M	31,78	7,99	0,16 [-27,68-5,74]	107,59	43,93	0,70 [-77,54-55,14]
Metilprednisolona 10^{-8} M	21,09	11,24	0,97 [-18,42-17,86]	97,68	35,16	0,96 [-63,31-60,73]

*desviación típica; ** Intervalo de confianza

Tabla 35. Expresión del antígeno HLA-DR en cultivos primarios de osteoblastos humanos tratados con dos dosis de Metilprednisolona (10^{-6} μ M y 10^{-8} μ M) mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan en % de expresión e intensidad de fluorescencia media (IMF).

HLA-DR						
Tratamiento	% de expresión	d.t.*	Valor p / IC** (95%)	IMF	d.t.	Valor p / IC (95%)
Control	23,78	14,40	1	103,80	37,99	1
Metilprednisolona 10^{-6} M	29,92	9,53	0,53 [-28,19-15,92]	107,12	41,83	0,90 [-68,75-62,11]
Metilprednisolona 10^{-8} M	32,71	7,42	0,35 [-30,33-12,47]	98,96	35,54	0,85 [-57,54-67,23]

*desviación típica; ** Intervalo de confianza

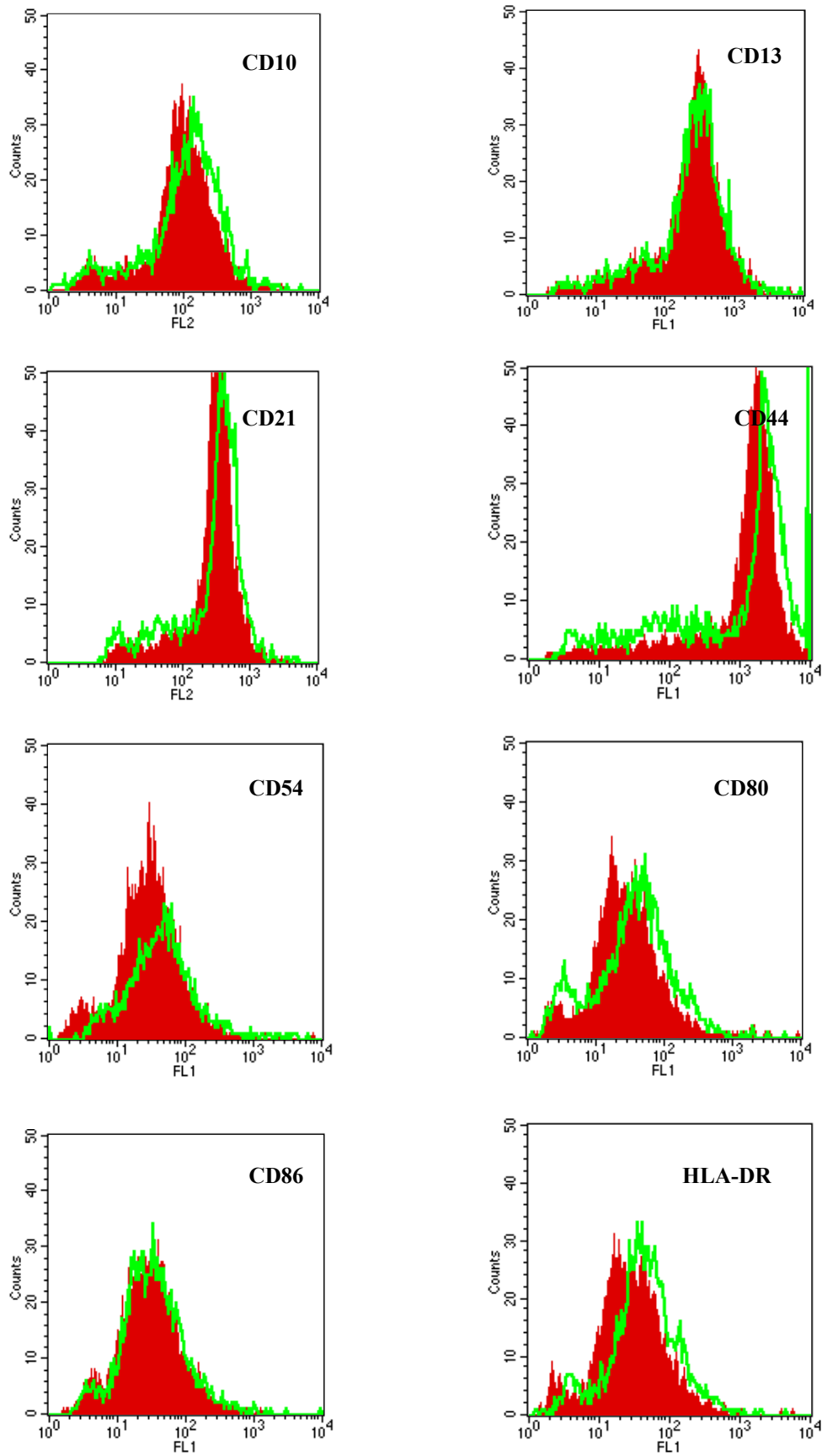


Figura 21. Histograma de fluorescencia obtenido mediante citometría de flujo para los distintos antígenos estudiados, en cultivos de osteoblastos humanos tratados con dosis de Metilprednisolona 10^{-8} M (verde) comparados con un grupo control, sin tratamiento (rojo).

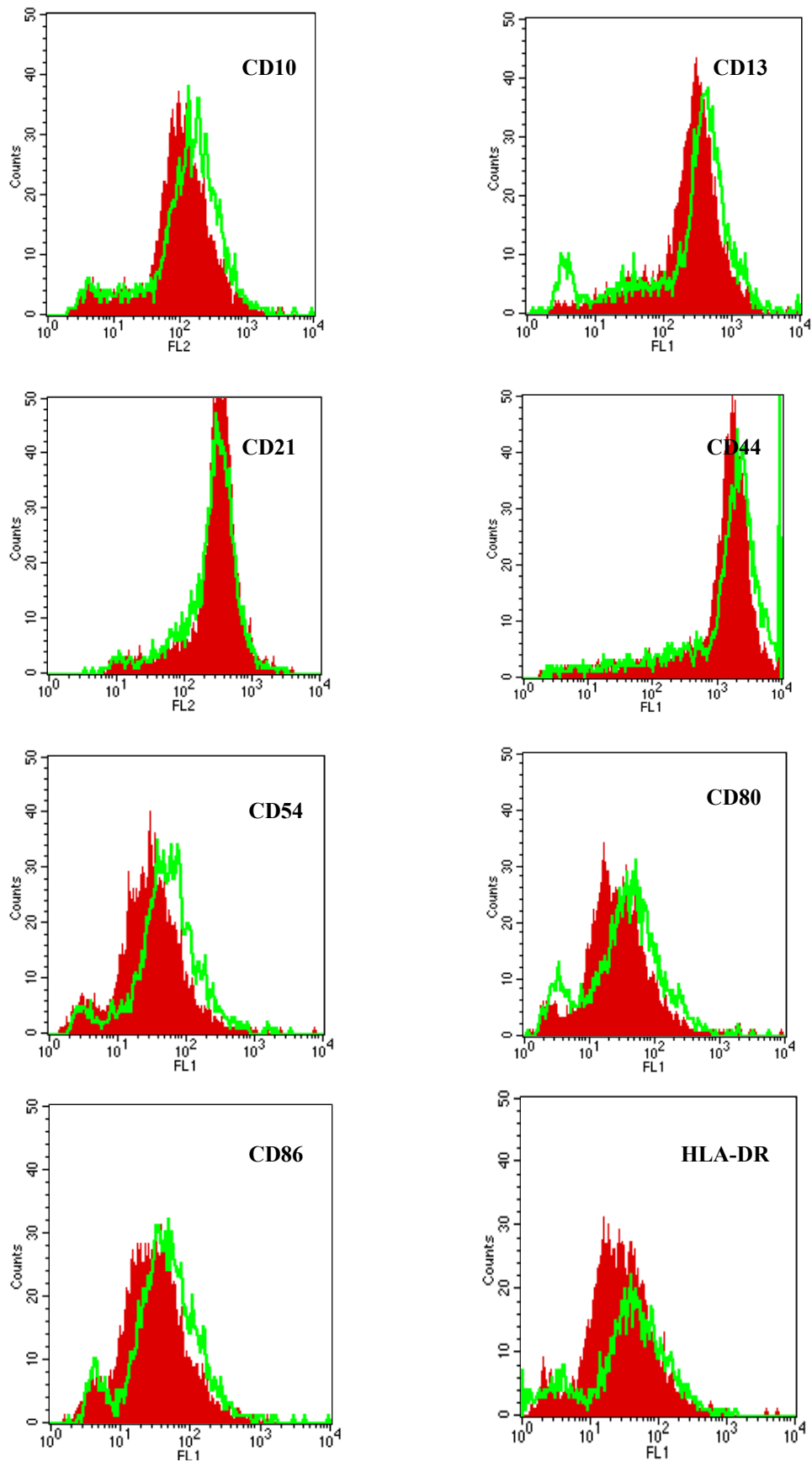


Figura 22. Histograma de fluorescencia obtenido mediante citometría de flujo para los distintos antígenos estudiados, en cultivos de osteoblastos humanos tratados con dosis de Metilprednisolona 10^{-6} M (verde) comparados con un grupo control, sin tratamiento (rojo).

3.3. Efecto de los antiinflamatorios sobre el ciclo celular

3.3.1. Efecto del tratamiento con Ibuprofeno sobre el ciclo celular

Tras el tratamiento con distintas dosis de Ibuprofeno, 5 y 25 μM , no se detectaron cambios significativos en el perfil de fluorescencia de las distintas fases del ciclo celular de los osteoblastos humanos estudiados, comparándolos con un grupo control que no recibió ningún tipo de tratamiento (Tabla 36).

Tabla 36. Perfil de fluorescencia del ciclo celular de los osteoblastos humanos en cultivo tratados con dos dosis de Ibuprofeno: 5 y 25 μM

		MEDIA	d.t.*	VALOR p	I.C.** (95%)
FASE G0-G1	Control	76,80	4,56	1	
	Ibuprofeno 5 μM	71,94	23,18	0,74	-33,02 – 42,72
	Ibuprofeno 25 μM	79,68	1,91	0,37	-10,80 – 5,04
FASE G2-M	Control	22,18	4,40	1	
	Ibuprofeno 5 μM	24,76	18,08	0,83	-33,99 – 28,81
	Ibuprofeno 25 μM	15,9	7,04	0,26	-7,05 – 19,58
FASE S	Control	1,35	0,88	1	
	Ibuprofeno 5 μM	2,95	3,69	0,50	-7,69 – 4,49
	Ibuprofeno 25 μM	4,40	5,14	0,37	-11,41 – 5,32

*desviación típica; ** Intervalo de confianza

3.3.2. Efecto del tratamiento con Paracetamol sobre el ciclo celular

El tratamiento con dosis 25 μM de Paracetamol no produjo cambio alguno en las distintas fases del ciclo celular de los osteoblastos en cultivo. En cambio si que se detectó una disminución en el perfil de fluorescencia en las fase G2-M y S al tratar las células con dosis 5 μM del antiinflamatorio. En la fase G0-G1, para esta misma dosis, los cambios observados no fueron significativos.

Tabla 37. Perfil de fluorescencia del ciclo celular de los osteoblastos humanos en cultivo tratados con dos dosis de Paracetamol: 5 y 25 μ M

		MEDIA	d.t.*	VALOR p	I.C.** (95%)
FASE G0-G1	Control	76,8	4,56	1	
	Paracetamol 5 μ M	80,27	3,90	0,37	-13,09 - 6,14
	Paracetamol 25 μ M	78,19	6,53	0,77	-14,16 - 11,38
FASE G2-M	Control	22,18	4,40	1	
	Paracetamol 5 μ M	9,71	6,30	0,04	0,13 - 24,79
	Paracetamol 25 μ M	17,18	9,81	0,46	-12,26 - 22,24
FASE S	Control	1,35	0,88	1	
	Paracetamol 5 μ M	10,00	4,32	0,02	-15,73 - (-1,56)
	Paracetamol 25 μ M	4,62	3,48	0,19	-9,02 - 2,48

*desviación típica; ** Intervalo de confianza

3.3.3. Efecto del tratamiento con Metilprednisolona sobre el ciclo celular

Como se observa en la tabla...la Metilprednisolona, a dosis de 10^{-8} y 10^{-6} M, no produjo alteraciones en el ciclo celular de los osteoblastos humanos en cultivo, ya que no se observaron cambios significativos en el perfil de fluorescencia del ciclo de vida de las células tratadas en comparación con el grupo control (sin tratamiento con el antiinflamatorio).

Tabla 38. Perfil de fluorescencia del ciclo celular de los osteoblastos humanos en cultivo tratados con dos dosis de Metilprednisolona: 10^{-8} y 10^{-6} M

		MEDIA	d.t.*	VALOR p	I.C.**(95%)
FASE G0-G1	Control	76,80	4,56	1	
	Metilprednisolona 10^{-6} M	81,37	8,22	0,44	-19,75 - 10,50
	Metilprednisolona 10^{-8} M	80,24	3,29	0,34	-12,46 - 5,57
FASE G2-M	Control	22,18	4,40	1	
	Metilprednisolona 10^{-6} M	15,15	8,72	0,28	-8,64 - 22,68
	Metilprednisolona 10^{-8} M	12,20	7,21	0,11	-3,56 - 23,52
FASE S	Control	1,35	0,88	1	
	Metilprednisolona 10^{-6} M	3,46	2,22	0,20	-5,94 - 1,72
	Metilprednisolona 10^{-8} M	7,55	4,0	0,06	-12,78 - 0,39

*desviación típica; ** Intervalo de confianza

3.4. Efecto de los antiinflamatorios sobre la capacidad fagocítica de osteoblastos humanos en cultivo frente a partículas de látex

Uno de los objetivos que se plantearon en el presente trabajo fue analizar el efecto de los antiinflamatorios estudiados sobre la capacidad fagocítica de los osteoblastos humanos en cultivo, un parámetro funcional poco estudiado hasta el momento. Para ello las células fueron tratadas con dosis de 5 y 25 μM de Paracetamol e Ibuprofeno y 10^{-6} y 10^{-8} M de metilprednisolona, y se incubaron durante 24 horas, como queda recogido en el correspondiente apartado de material y métodos de este documento.

3.4.1. Efecto del tratamiento con Ibuprofeno sobre la capacidad fagocítica de osteoblastos humanos en cultivo

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 39 y figura 23. Como puede observarse, el tratamiento con Ibuprofeno no produjo cambio alguno en la capacidad fagocítica de los osteoblastos humanos en cultivo al compararse con los cultivos que no recibieron ningún tipo de tratamiento.

Tabla 39. Modulación de la capacidad fagocítica de los osteoblastos humanos en cultivo tras su tratamiento con dos dosis de Ibuprofeno (5 y 25 μM) determinado mediante citometría de flujo. Los resultados se expresaron en % de expresión positiva e intensidad de fluorescencia media (IMF)

LÁTEX						
Tratamiento	% de expresión	d.t.*	Valor p / IC** (95%)	IMF	d.t.	Valor p / IC (95%)
Control	51,25	17,13	1	169,71	109,50	1
Ibuprofeno 5 μM	60,13	21,15	0,51 [-39,59-21,83]	203,14	152,18	0,71 [-239,45-172,58]
Ibuprofeno 25 μM	64,14	23,48	0,37 [-44,92-19,14]	132,64	23,47	0,59 [-119,08-193,22]

*desviación típica; ** Intervalo de confianza

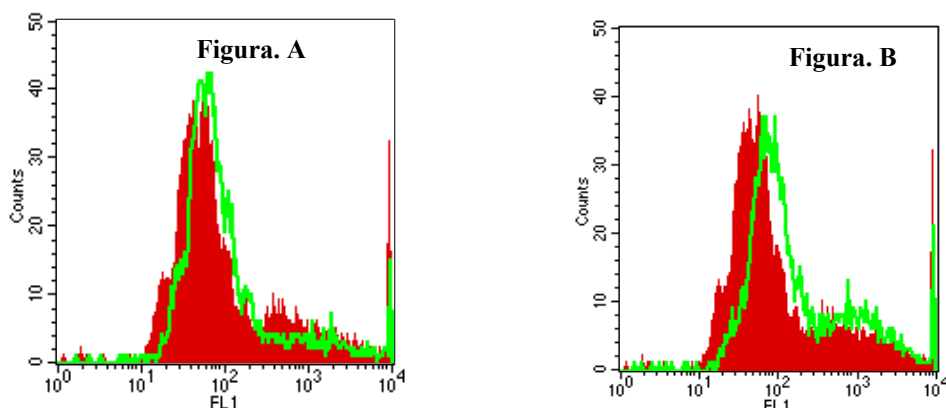


Figura 23. Histograma de fluorescencia de la capacidad fagocítica de los osteoblastos humanos en cultivo tras su tratamiento con dos dosis de Ibuprofeno determinado mediante citometría de flujo. A) Ibuprofeno 5 μ M; B) Ibuprofeno 25 μ M

3.4.2. Efecto del tratamiento con Paracetamol sobre la capacidad fagocítica de osteoblastos humanos en cultivo

Como podemos observar en la tabla 40 y figura 24 tras el tratamiento con ambas dosis de Paracetamol, la capacidad fagocítica de los osteoblastos no sufrió cambios significativos en comparación con el grupo control (cultivos que no fueron tratados con el antiinflamatorio).

Tabla 40. Modulación de la capacidad fagocítica de los osteoblastos humanos en cultivo tras su tratamiento con dos dosis de Paracetamol (5 y 25 μ M) determinado mediante citometría de flujo. Los resultados se expresaron en % de expresión positiva e intensidad de fluorescencia media (IMF)

LÁTEX						
Tratamiento	% de expresión	d.t.*	Valor p / IC** (95%)	IMF	d.t.	Valor p / IC (95%)
Control	51,25	17,13	1	169,71	109,50	1
Paracetamol 5 μ M	57,64	16,14	0,60 [-34,57-21,79]	122,48	65,48	0,52 [-118,21-212,67]
Paracetamol 25 μ M	57,00	27,10	0,70 [-39,98-28,50]	161,61	110,45	0,92 [-175,44-191,64]

*desviación típica; ** Intervalo de confianza

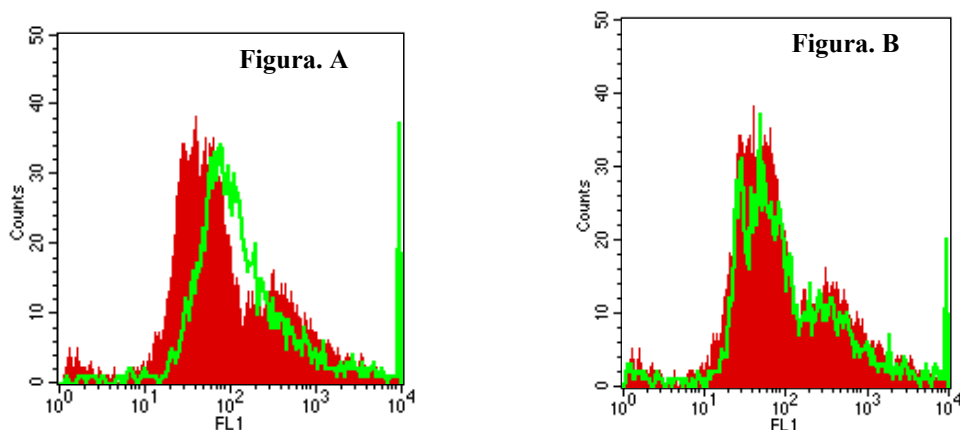


Figura 24. Histograma de fluorescencia de la capacidad fagocítica de los osteoblastos humanos en cultivo tras su tratamiento con dos dosis de Paracetamol determinado mediante citometría de flujo. A) Paracetamol 5 μ M; B) Paracetamol 25 μ M

3.4.3. Efecto del tratamiento con Metilprednisolona sobre la capacidad fagocítica de osteoblastos humanos en cultivo

La Metilprednisolona, a dosis de 10^{-6} y 10^{-8} M no produjo cambios significativos en relación a la capacidad fagocítica de los osteoblastos humanos en cultivo (tabla 41 y figura 25).

Tabla 41. Modulación de la capacidad fagocítica de los osteoblastos humanos en cultivo tras su tratamiento con dos dosis de Metilprednisolona (10^{-6} y 10^{-8} M) determinado mediante citometría de flujo. Los resultados se expresaron en % de expresión positiva e intensidad de fluorescencia media (IMF)

LÁTEX						
Tratamiento	% de expresión	d.t.*	Valor p / IC** (95%)	IMF	d.t.	Valor p / IC (95%)
Control	51,25	17,13	1	169,71	109,50	1
Metilprednisolona 10^{-6} M	54,72	16,95	0,78 [-32,02-25,09]	74,66	44,45	0,20 [-64,71-254,81]
Metilprednisolona 10^{-8} M	53,71	31,45	0,88 [-39,56-34,64]	139,96	91,71	0,70 [-145,36-204,86]

*desviación típica; ** Intervalo de confianza

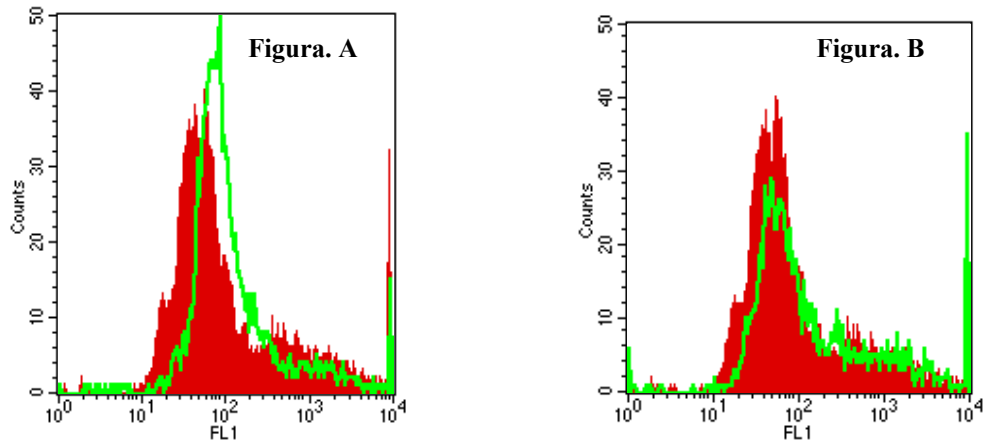


Figura 25. Histograma de fluorescencia de la capacidad fagocítica de los osteoblastos humanos en cultivo tras su tratamiento con dos dosis de Metilprednisolona determinado mediante citometría de flujo. A) Metilprednisolona 10^{-8} M; B) Metilprednisolona 10^{-6} M

V. DISCUSIÓN

1. EXPRESIÓN DE MARCADORES ANTIGÉNICOS DE LOS OSTEÓBLASTOS PRESENTES EN CORTES DE TEJIDO ÓSEO

Los osteoblastos, clásicamente, se han caracterizado por su localización en el hueso, su morfología fusiforme, por poseer actividad fosfatasa alcalina y sintetizar distintas sustancias de naturaleza proteica como el colágeno tipo IV o la osteocalcina. Los estudios llevados a cabo en la presente Tesis Doctoral permiten incluir un nuevo parámetro de identificación para esta población celular como la expresión de los antígenos CD10 y CD44.

En estudios llevados a cabo en cultivos de osteoblastos humanos se ha observado mediante citometría de flujo una intensa expresión de los antígenos CD10, CD13 y CD44, detectándose en el 95% de la población analizada. Dicha combinación de marcadores junto a la fosfatasa alcalina han sido considerados como marcadores característicos y constitutivo de esta población celular (Reyes-Botella et al., 1999; Reyes-Botella et al., 2000; Reyes-Botella et al., 2002). Sin embargo otros autores con anterioridad consideraron que cambios en los niveles de expresión del CD44 podían ser utilizados para identificar células de linaje osteoblástico en distintos niveles de maduración; ya que dicha expresión se inicia en el osteoblasto y se acentúa en el osteocito (Aubin, 1995).

Nakamura y cols. (Nakamura, Kenmotsu, et al. 1995) describieron la expresión del antígeno CD44 durante el cambio de osteoblastos a osteocitos siguiendo una técnica de inmunohistoquímica, mientras que Reyes y col. (Reyes-Botella et al., 2000) describieron la expresión positiva del antígeno CD44 en osteoblastos humanos analizando cultivos primarios con anticuerpos monoclonales y citometría de flujo. Las diferencias entre ambos estudios se atribuyeron principalmente a la diferencia de sensibilidad de las técnicas de estudio utilizadas en cada caso.

Un aspecto que podría ser discutido de la aportación realizada por Reyes y col. (Reyes-Botella et al., 2000) sobre el papel identificativo de los marcadores CD10 y CD44 para los osteoblastos es el posible efecto modulador sobre la expresión antigénica de los factores hormonales y/o factores de crecimiento presentes en el suero bovino fetal utilizado para el cultivo de estas células. El uso de cortes de tejido elimina dicho

inconveniente, en detrimento de la sensibilidad. Por lo que los datos obtenidos sobre la expresión antigénica de los osteoblastos en cortes de tejido óseo aporta una información a nuestro juicio valiosa que permite afirmar que la combinación de los antígenos CD10 y CD44 es una característica propia de esta población celular.

Otros de los marcadores descritos en cultivos de osteoblastos humanos son los antígenos CD54, CD80 y HLA-DR (Reyes-Botella et al., 2000), pero su expresión solo se detectó en una subpoblación de las células analizadas, por lo que dichos antígenos no son considerados constitutivos. Además, es conocido que en otras poblaciones celulares donde son descritos, su expresión puede ser modulada bajo condiciones experimentales (Groenewegen, Buurman, et al., 1985) e incluso en reacciones inflamatorias (Terai, Kohno, et al. 1990). Estas moléculas, clásicamente son descritas como moléculas coestimuladoras, que cooperan en la activación de las células T y se expresan en células envueltas en la presentación de antígenos y la activación de células T. La expresión débil o variable de estos antígenos en cortes de tejidos no descarta por completo su presencia en estas células ya que como hemos indicado antes la inmunohistoquímica es una técnica con limitaciones a nivel de sensibilidad, pudiendo no detectar aquellos antígenos que se expresen en baja densidad.

Estudios realizados con cultivos primarios de osteoblastos humanos muestran que el tratamiento con distintas biomoléculas puede modular su expresión. El TGF β 1, un factor de crecimiento característico del tejido óseo reduce la expresión del CD54 y del CD86. Mientras que el tratamiento con una citoquina proinflamatoria como la IL-1 β aumenta la expresión de CD54, CD86 y HLA-DR. Paralelamente, el tratamiento con IFN- γ aumenta de forma significativa la expresión de marcadores como el CD54, CD80, CD86 y HLA-DR. Estos datos sugieren que la expresión de estos antígenos se puede inducir en osteoblastos humanos, pudiendo aumentarse su expresión por distintas biomoléculas presentes en el tejido óseo como hormonas y citoquinas. Esto explicaría que en condiciones fisiológicas los osteoblastos presentes en el tejido óseo no expresen dichos marcadores o que su expresión sea tan débil que no se detecte por técnicas de inmunohistoquímica como la utilizada en el presente estudio.

Nuestros datos muestran además que los osteoblastos presentes en cortes de tejido óseo son IFN- γ positivos. El IFN- γ es una citoquina sintetizada principalmente por los linfocitos T, los macrófagos y las células Natural Killer (células NK); la cual tiene un papel activo en procesos inflamatorios, regula la expresión de moléculas de adhesión y participa activando funciones inmunológicas como la actividad fagocítica (Majumdar, Keane-Moore, et al., 2003; Mucci, Varesio, et al., 2003). La expresión de dicha citoquina en los osteoblastos nos sugiere que en determinadas circunstancias no fisiológicas, tales como un trauma o el contacto del hueso con material protésico, dicha molécula podría tener un papel autocrino, regulando la expresión de moléculas implicadas en la presentación antigénica (CD54, CD80, CD86 y HLA_DR) y/o en la propia capacidad fagocítica descrita en estas células. No obstante, pensamos que el IFN- γ no debe ser la única citoquina capaz de ejercer este efecto sobre los osteoblastos, sino que otras citoquinas pueden estar igualmente implicadas en el proceso de modulación antigénica lo que podría a su vez modular aspectos funcionales de esta población celular.

La expresión positiva de IL-12 e IL-15 en cortes de tejido óseo descrita por nosotros en el presente trabajo, confirma los datos obtenidos por otros autores en líneas celulares de osteoblastos (Bost, Ramp, et al., 1999). Ambas citoquinas están implicadas en numerosas funciones inmunológicas efectoras. Así, la IL-12 es un potente regulador de la respuesta inmune frente a desafíos antigénicos, siendo especialmente requerida para la respuesta antimicrobiana frente a patógenos intracelulares (Langrish et al., 2004; Beadling & Slifka, 2006). La IL-15 juega un papel clave en la proliferación y activación de células NK y Linfocitos T CD8⁺ (Budagian, Bulanova, Paus, & Bulfone-Paus, 2006).

Tanto los macrófagos como las células dendríticas sintetizan IL12 e IL-15, las cuales a su vez inducen de manera potente la producción de IFN- γ (Trinchieri & Gerosa, 1996; Banchereau, Briere, et al., 2000). Este hecho relaciona a los osteoblastos con estas poblaciones celulares, junto a la expresión de determinados antígenos y la capacidad funcional descrita en osteoblastos en cultivo como la estimulación alogénica de linfocitos T o la capacidad fagocítica (Ruiz et al., 2003).

Los resultados obtenidos en cortes de tejido óseo permiten confirmar que los osteoblastos humanos presentan un perfil antigénico propio, con la expresión de una serie de antígenos constitutivos como el CD10, CD44 y fosfatasa alcalina y una serie de antígenos modulables, como son los antígenos implicados en los procesos de activación y/o presentación antigénica a las células T, como el CD54, CD80 o HLA-DR, cuya expresión y especialmente su intensidad posiblemente dependa de la presencia de determinadas citoquinas y/o factores de crecimiento en el entorno. Demostrándose así, que la expresión de determinados antígenos descrita en cultivos de osteoblastos humanos no es sólo un hecho que ocurre *in vitro*, debido a la presencia de factores inductores sino que estos también son detectados en una proporción importante en células frescas o no cultivadas. Además, sugieren que los osteoblastos pueden desempeñar funciones similares a las de los macrófagos y células dendríticas.

2. EFECTO DEL PRP SOBRE DIFERENTES PARÁMETROS CELULARES Y MOLECULARES DE OSTEÓBLASTOS HUMANOS EN CULTIVO

La función, tal vez más importante y conocida de los osteoblastos es la de ser las células responsables de la formación de hueso, este hecho hace que dicha población celular juegue un papel fundamental en aquellos procesos o intervenciones en los que se requiera, para la correcta o favorable evolución de los mismos, la reparación ósea y por lo tanto la proliferación del osteoblasto para la formación de nuevo tejido óseo. En dichos procesos o intervenciones es común el uso de distintas biomoléculas con utilidad clínica. Bien, con el fin de acelerar o favorecer la regeneración ósea, o bien, con el fin de controlar o disminuir el cuadro sintomático propio que acompaña a un traumatismo óseo o a una intervención en dicho tejido, como es el caso de los antiinflamatorios. Creemos que es de sumo interés, desde el punto de vista clínico, conocer y valorar el posible efecto que estas sustancias puedan tener sobre las células responsables del crecimiento óseo, especialmente si tenemos presente que, las células que son sometidas a tratamientos con diferentes factores de crecimiento, pueden sufrir alteraciones irreversibles que habría que controlar.

En este sentido, el uso de PRP se ha extendido en los últimos años, como vehículo portador de factores de crecimiento; sobre todo, en el tratamiento de defectos óseos a nivel oral y maxilofacial. Sin embargo, el seguimiento y estudio de las ventajas de la aplicación del PRP se ha limitado fundamentalmente a aspectos macroscópicos (Carlson & Roach, 2002; Fennis, Stoelinga & Cansen, 2002; Tozum & Demiralp, 2003) y son prácticamente inexistentes los estudios a nivel celular y/o molecular. Además los antecedentes bibliográficos son, en general, contradictorios

Aunque el uso del PRP ha sido apoyado por muchos clínicos otros autores señalan el escaso interés biológico del PRP argumentando que este concentrado plaquetario no aporta beneficio adicional (Schmitz & Hollinger, 2001; Shanaman, Filstein, et al., 2001; Froum, Wallace, et al., 2002; Jensen, Rahbek, et al. 2004). Frente a los estudios realizados por Anitua y col., Kassolis y col., Marx y col. o Camargo y col (Anitua, 1999; Kassolis, Rosen, et al., 2000; Marx, Carlson, et al. 1998; Camargo, Lekovic, et al. 2002), donde se describe un efecto beneficioso del PRP *in vivo*, al obtener resultados muy satisfactorios en términos de regeneración ósea, se encuentran

los trabajos de Froum y col., Schitz y col., Shanaman y col. o Jensen y col. (Froum, Wallace, et al. 2002 ; Schmitz & Hollinger 2001; Shanaman, Filstein, et al. 2001; Jensen, Rahbek, et al. 2004) que afirma que el PRP aporta muy pocos beneficios en el proceso de regeneración ósea. Si bien hemos de señalar que concretamente en el trabajo de Forum y col. (Froum, Wallace, et al. 2002) se incluyen datos correspondientes a tres pacientes con múltiples variables. De modo que ha cada paciente se le realizó un tratamiento distinto (PRP junto con implantes, injertos o biomateriales diversos), con lo cual consideramos que los resultados no son comparables. En esta misma línea se pronuncia Marx en el año 2004, que llega a considerar que muchos de los artículos que afirman que el PRP aporta muy pocos beneficios en el proceso de regeneración ósea se debe, en muchas ocasiones, a que no usan PRP auténtico, por ejemplo muchos utilizan un concentrado plaquetario que, por las características de su obtención, dañan las plaquetas, o son estudios con escasos datos, lo que impide sacar datos lo suficientemente significativos como para obtener conclusiones (Marx, 2004).

Recientemente, se ha realizado una revisión sistemática sobre la evolución y ventajas de distintas técnicas de elevaciones sinusales con distintos tipos de injertos, entre las que se incluye el PRP asociado a material del injerto y, a pesar de los efectos beneficiosos y favorables que se muestran en la literatura sobre el uso del PRP, los autores concluyen que hay insuficientes datos para recomendar el uso del PRP junto con injertos óseos en técnicas de elevaciones de seno (Wallace & Forum, 2003; Boyapati & Wang, 2006). Por lo que sugieren un estudio más detallado del PRP para uso clínico. En este sentido, creemos que nuestros resultados ayudaran a explicar y comprender mejor algunos aspectos, no del todo claros, del efecto del PRP sobre el tejido óseo. Para ello, ha sido de utilidad estudiar el efecto directo del PRP sobre los osteoblastos, centrados principalmente en determinar su acción sobre la proliferación a corto y largo plazo y muy especialmente sobre el ciclo celular; ayudando a esclarecer el papel del PRP a nivel local y garantizando la inexistencia de posibles riesgos de transformaciones celulares no deseadas.

En nuestros ensayos hemos observado que las líneas de osteoblastos humanos, establecidas a partir del aislamiento y cultivo de muestras de tejido óseo, en presencia de PRP del mismo individuo (PRP autólogo), muestran una tasa de crecimiento significativamente superior a la que muestran las líneas establecidas a partir de las

mismas muestras de tejido en presencia de suero bovino fetal. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos por Ferreira y col. (Ferreira, Carriel Gomes, et al., 2005), los cuales analizan el efecto de concentraciones crecientes de PRP (6.125, 12.5, 25 y 50%), con o sin suero bovino fetal, sobre la proliferación de la línea hFOB1.19 que es una línea estandarizada de osteoblastos transformados. De sus experiencias se deduce que la proliferación celular fue mayor cuanto mayor era la concentración de PRP. No obteniendo resultados significativos estadísticamente para las concentraciones de 6.125 y 12.5. Además estos autores concluyen que el suero bovino fetal no es necesario para estimular la proliferación de osteoblastos cuando se adiciona PRP. En nuestros estudios también observamos que no era imprescindible la presencia del suero bovino fetal para que las células proliferasen por lo que en ningún ensayo se incluyeron ambos PRP y suero bovino fetal, ya que consideramos que interferiría nuestra lectura. En cuanto a la concentración utilizada no hemos considerado conveniente aumentarla; ya que, como es sabido los cultivos primarios con dosis de suero bovino fetal superiores al 20% pueden sufrir transformación neoplásica.

En estudios de PRP son otras líneas celulares se han obtenido resultados equivalentes a los obtenidos por nosotros. Lukarelli y col. (Lucarelli, Beccheroni, et al., 2003) investigaron la proliferación de células mesenquimales en medio de cultivo suplementado con PRP y verificaron que el uso de PRP al 10% fue suficiente para acelerar la mineralización *in vitro*. De hecho estudios recientes demuestran que concentraciones de plasma rico por encima del 30% afectan de manera negativa a la proliferación y a la viabilidad de las células óseas (Choi, Zhu, et al., 2005). Igualmente, en estudios realizados con células de la médula ósea de rata se observa que tanto el PRP como el PRD (Plasma Pobre en Plaquetas) a concentraciones de 1.0, 2.0, 4.0 y 10 μ l/ml, aumentan la proliferación celular de manera significativa comparado con grupos controles. E incluso este aumento fue mayor en cultivos tratados con PRP que en aquellos tratados con PPD, en los que también observaron aumento (Ogino, Ayukawa, et al., 2005)

Aunque nuestros resultados muestran claramente que la proliferación de los osteoblastos es significativamente mayor en las líneas establecidas con PRP, como observamos en la figura 1, también es claramente llamativo el envejecimiento o

agotamiento prematuro que sufren estas líneas celulares. De momento desconocemos si este hecho tendrá repercusiones *in vivo*.

Otro objetivo importante de nuestro estudio ha sido estudiar el efecto que presenta el PRP sobre el ciclo celular de los osteoblastos. La cuantificación del ADN permite determinar la distribución de una población celular a lo largo del ciclo celular. Los estudios del ciclo celular por citometría de flujo proporcionan un histograma que muestra el contenido de ADN, con un perfil típico donde se caracterizan tres regiones: G₀/G₁, G₂/M y S. El estudio del ciclo celular tiene gran relevancia en biomedicina, ya que permiten detectar, de forma sencilla, la presencia de anomalías en el contenido genético de poblaciones celulares (aneuploidías), determinar agentes que activan o inhiben la proliferación, o cuantificar la proporción de muerte por apoptosis.

El perfil del ADN de los osteoblastos en presencia de PRP revela que no hay alteraciones importantes que hagan sospechar transformación neoplásica de la población analizada, ya que no se detectaron en ninguna de las líneas analizadas aneuploidías. Bajo este término en citometría de flujo se incluyen todas las alteraciones cuantitativas del ADN, en las que las células denominadas aneuploides muestran una cantidad de ADN diferente a la que se detecta en las células normales diploides (Orfao, 1995). Los resultados recogidos en la tabla 8 y figura 10 muestran que el efecto que ejerció el PRP a nivel de los distintos estadios del ciclo celular sugieren una activación de la proliferación como consecuencia del cultivo en presencia de PRP, con un aumento de la proporción de la fase G₀/G₁, lo que guarda relación con los resultados obtenidos en los ensayos de proliferación. A la fecha no tenemos conocimiento de la existencia de otros trabajos que estudien el efecto del PRP sobre el ciclo celular, ya sea en osteoblastos o en otra población celular, lo que no nos permite realizar una discusión y valoración comparativa de los mismos.

Nuestro grupo de investigación es pionero en los estudios de perfil antigénico en cultivos primarios de osteoblastos, lo que le ha llevado a describir un nuevo papel funcional en esta población celular, al clásicamente atribuido en la proliferación y reparación del tejido óseo. Esta nueva perspectiva funcional surge al correlacionar su expresión antigénica con la capacidad de presentadora de antígeno y la función fagocítica (Reyes-Botella et al., 1999; Reyes-Botella, Montes, et al., 2000; Reyes-

Botella et al., 2002; Ruiz et al., 2003; Perez, Garcia-Martinez, Arroyo-Morales, Reyes-Botella, & Ruiz, 2006). Ello explica que en el presente trabajo nos preguntásemos si el PRP tiene algún efecto sobre el perfil antigénico de los osteoblastos humanos en cultivo.

Nuestros resultados mostraron que la presencia del PRP no produjo cambios a nivel de la expresión de los antígenos tales como las aminopeptidasas CD10 y CD13, el CD44 y la fosfatasa alcalina. Estos datos guardan relación con la denominación propuesta por Pérez y col. (Perez, Garcia-Martinez, et al., 2006) como antígenos constitutivos, así como, con los resultados obtenidos en cortes de tejido óseo.

Pérez y col. (Perez, Garcia-Martinez, et al. 2006) muestran en estudios realizados en cultivos primarios de osteoblastos humanos, que el tratamiento de estas células con distintos factores de crecimiento y/o citoquinas, como TGF- β ₁, FGFb, PDGF-BB, IL-1 β , IL-2, IFN γ y LPS no varía la expresión de dichos marcadores. Sin embargo, los antígenos que no se detectan en la totalidad de la población, como CD54, CD80, CD86, y HLA-DR, ven modulada su expresión como consecuencia del tratamiento, por lo que a dichos antígenos se les considera antígenos modulables, cuya expresión parece depender del estado de diferenciación y /o activación de la célula. Concretamente, el tratamiento con TGF- β ₁ durante 24 h a dosis de 0.1 ng/ml, produjo un descenso significativo de la expresión de los antígenos CD54 y CD86. Por el contrario, y como consecuencia del tratamiento con IL-1 β se detectó un incremento en el porcentaje de expresión del CD54, CD86 y HLA-DR. El tratamiento tanto con IFN γ como LPS incremento la expresión de de los antígenos CD54, CD80, CD86 y HLA-DR. No describiendo cambios por el tratamiento con FGFb, PDGF-BB e IL-2. Los autores propone que la respuesta de los osteoblastos a distintos factores de crecimiento y /o citoquinas modula la expresión de antígenos que guardan relación con la capacidad funcional de estas células. Y dicha modulación es controlada por la presencia de ciertos factores de crecimiento presente habitualmente en el tejido óseo que promueven la maduración y diferenciación de las células de linaje osteoblástico. En situaciones proinflamatorias habría una activación del papel inmunológico de esta población como célula presentadora de antígeno.

El análisis del efecto del PRP sobre los antígenos, que con anterioridad hemos denominado modulables, mostró cambios significativos en su expresión. En general hemos observado que el PRP incrementa de forma significativa la expresión de los antígenos implicados en la presentación antigénica como es el CD54, CD80, CD86 y HLA-DR, e igualmente el antígeno de activación celular CD69.

La valoración de todos los datos obtenidos sobre el efecto del PRP sobre la expresión antigénica, en relación con lo descrito en bibliografía, nos sugieren que el PRP actúa ejerciendo un enlentecimiento en el proceso de maduración y diferenciación del osteoblasto. Ya que, estos antígenos parece que disminuyen en el proceso de maduración lo que explica que factores de crecimiento específicos del tejido óseo como TGF β 1 o FGFb actúen disminuyendo la expresión o no variándola. Por otra parte, esta interpretación de la relación de la expresión de estos antígenos con el grado de maduración celular guarda relación, también, con los resultados obtenidos en los ensayos de proliferación, donde observamos un incremento de la capacidad de crecimiento tras el cultivo en presencia de PRP, ya que, como es bien sabido, las células cuanto más indiferenciadas son, mayor capacidad de crecimiento presentan (Reyes-Botella, Vallecillo-Capilla, et al., 2002).

Inicialmente, al estudiar el perfil antigénico de los osteoblastos en cortes de hueso, sugeríamos que esta población guarda un gran parecido con otras poblaciones celulares, aún sin perder su identidad, como las células dendríticas, compartiendo con ellas la expresión de determinados antígeno y su función inmunológica. En estudios llevados a cabo en células dendríticas se han obtenido resultados relacionados con los aquí descritos, de modo que las células dendríticas en presencia de ácido lipoteicoico y muramildipeptido aumentan la síntesis de citoquinas proinflamatorias y la expresión de antígenos como CD86. Lo que en esta población es un signo de maduración y activación funcional como célula presentadora de antígeno (Kim et al., 2007; Steinbrink et al., 2000).

En el caso de los osteoblastos no creemos que la función típica, como célula madura, sea su actividad funcional inmunológica, sino que ésta es un recurso funcional ante determinadas circunstancias, como la presencia de agentes extraños entre los que se encuentran los microorganismos o los restos de material protésico. En este sentido

Schrum y col. (Schrum et al., 2003) muestran como, ante la presencia de *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* se incrementa la expresión de moléculas de clase II en osteoblastos murinos y humanos. También, es descrito que la infección del tejido óseo con *S. aureus* y *S. enterica* incrementa la expresión del antígeno CD40, molécula que es expresada entre otras por las células dendríticas y posee un papel importante en la activación celular en el proceso de presentación del antígeno (Schrum et al., 2003)

Otra posible interpretación de nuestros resultados es que en el PRP contenga determinadas biomoléculas que actúen de manera equivalente a las sustancias proinflamatorias como la IL-1 o el IFN γ . Recientemente se ha descrito, que la contaminación de concentrados plaquetarios por glóbulos blancos es una fuente de citoquinas como IL-1 β , IL-6, IL-8 o TNF α lo que provoca tras su almacenaje la liberación de dichas sustancias que pueden producir efectos no deseado cuando se administran dichos concentrados a pacientes (Shaiegan, Pourfatollah, Namiri, & Babae, 2006).

En esta misma línea se pronuncia Dohan y col, en estudios con PRF (fibrina rica en plaquetas). Estos autores indican que el uso de este nuevo tipo de concentrado en plaquetas abre una nueva línea de interés para el uso terapéutico del mismo; ya que, no solo aporta factores de crecimiento, sino que incluye diferentes citoquinas, entre las que se cita la IL-1 β , la IL-6, y el TNF α , que podrían ejercer un papel inmuno regulador y estimular los mecanismos de defensa. De modo que, en lugares donde se ha intervenido quirúrgicamente y que son tratados con PRF, las citoquinas atrapadas en la fibrina pueden ser liberadas y ejercer su acción durante la remodelación inicial de la matriz ósea (Dohan & Choukroun, 2006).

Nuestros resultados muestran que el PRP puede tener interés clínico en la terapia de rehabilitación oral mediante implantes en la que interesa reducir el tiempo de regeneración ósea favoreciéndose la óseo integración en el menor tiempo (Mundy, Boyce, et al., 1995; Reyes-Botella, Montes, et al., 1999; Reyes-Botella, Montes, et al., 2002) y sin comprometer a la población; ya que, no se detectan alteraciones en el ciclo celular que así lo indiquen. Junto a los efectos beneficiosos que se acaban de describir, el PRP es una sustancia fácil de obtener y puede prepararse de manera rápida, causando

el mínimo perjuicio los pacientes. Además, de no requerirse grandes cantidades de sangre (10-40 cm³) el hecho de que sea una preparación autóloga minimiza los riesgos de contagio o de padecer reacciones inmunológicas.

No obstante, el hecho que el PRP acelere el envejecimiento de la población es un dato que nos inquieta y que de momento no sabemos explicar; por lo que sugerimos que sería conveniente hacer un seguimiento del efecto que presenta el PRP *in vivo* a largo plazo, ya que su uso clínico es relativamente reciente y se carecen de dichos datos actualmente.

3. EFECTO DEL IBUPROFENO, PARACETAMOL Y METILPREDNISOLONA SOBRE DISTINTOS PARÁMETROS CELULARES Y MOLECULARES DE OSTEÓBLASTOS HUMANOS EN CULTIVO

Los resultados de este estudio apoyan la hipótesis de que ciertos antiinflamatorios, tanto esteroideos como no esteroideos, pueden afectar a distintos parámetros celulares de osteoblastos humanos en cultivo, parámetros que juegan un papel importante en los procesos de reparación ósea, como son la proliferación celular o el ciclo celular.

Los AINES son el grupo de fármacos al que pertenecen la mayor parte de los analgésicos más utilizados en la clínica odontológica, fundamentalmente para el alivio del dolor postoperatorio agudo y la inflamación crónica. Aunque con ciertos matices, todos comparten un mecanismo de acción común, que es la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, lo que condiciona que su espectro de acción sea similar, incluyendo además del efecto analgésico, la capacidad de bajar la fiebre así como cierto efecto antiinflamatorio. Desde el punto de vista clínico, como evitan la síntesis de prostaglandinas pero no los efectos de las prostaglandinas ya sintetizadas, deben administrarse si es posible antes de que aparezca el cuadro inflamatorio. Evidentemente, no siempre existe esta posibilidad, pero sí en determinadas situaciones como podría ser la extracción de un tercer molar incluido o tras la colocación de un implante dental, casos en los que debería administrarse el antiinflamatorio antes de que desaparezca el efecto del anestésico local. Sin embargo, desde el punto de vista celular y/o molecular, las consideraciones sobre el uso de este tipo fármacos podrían cambiar, ya que hay ciertos estudios que hablan de un efecto inhibitor de los antiinflamatorios sobre el crecimiento y reparación ósea (Ho et al., 1995; Tornkvist et al., 1980; Tornkvist et al., 1980; Keller et al., 1987).

Los glucocorticoides son otro tipo de fármacos que pertenecen al grupo de antiinflamatorios esteroideos. Su uso está menos extendido en la práctica odontológica diaria, sin embargo sí que se está empleando, sobre todo la metilprednisolona, tras cirugía maxilofacial, generalmente a dosis única y recién terminada la intervención, con objeto de minimizar en la medida de lo posible el proceso inflamatorio. Aunque el efecto de los glucocorticoides sobre el tejido ósea se ha descrito previamente (van Staa,

Leufkens, Abenhaim, Zhang, & Cooper, 2000; Cooper et al., 1999; Manolagas, 2000) los mecanismos biológicos de cómo estos fármacos influyen sobre las células óseas, en qué momento y sobre qué parámetros hoy en día no están del todo claros y plantean ciertas controversias.

En esta Tesis Doctoral nos hemos centrado en valorar el efecto de tres antiinflamatorios, Ibuprofeno, Paracetamol y Metilprednisolona, sobre distintos parámetros celulares que juegan un importante papel en el proceso de reparación ósea. Se han seleccionado estos antiinflamatorios porque son los más empleados para el alivio del dolor e inflamación en la práctica clínica odontológica, sobre todo tras intervenciones quirúrgicas que afectan al hueso como las extracciones dentales o quistectomías, donde se requiere normalmente una rápida recuperación del hueso para su pronta rehabilitación, o tras la colocación de implantes dentales donde se precisa del rápido crecimiento óseo en torno a las fijaciones para asegurar su oseointegración (Esplugues, J., 1993).

Para llevar a cabo nuestro estudio hemos obtenido poblaciones celulares a partir de muestras de hueso obtenidas de pacientes voluntarios sanos sometidos a la extracción de terceros molares incluidos, cultivándose en medios de cultivo con suero bovino fetal y distintas dosis de los antiinflamatorios a estudiar, con objeto de analizar el posible efecto de éstos fármacos sobre diferentes parámetros celulares, tales como perfil antigénico, proliferación o ciclo celular.

El estudio se realizó utilizando dosis de antiinflamatorio que correspondieran al rango terapéutico utilizado en la práctica diaria, 5 y 25 μM para el Ibuprofeno y el Paracetamol y 10^{-8} y 10^{-6} M para la Metilprednisolona, dosis que fueron ajustadas a una densidad celular predeterminada y similar en todos los casos estudiados.

Las condiciones de cultivo de las células, con medio suplementado con suero bovino fetal, fueron las idóneas para permitir un adecuado crecimiento celular, lo que permite mantener las células en condiciones óptimas durante el periodo de realización de las experiencias. Es precisamente este protocolo de actuación el que nos aseguró en parte, que los resultados obtenidos en relación a la disminución de la proliferación

celular sean debidos precisamente al efecto del antiinflamatorio empleado y no a la ausencia de nutrientes para las células y/o de factores de crecimiento.

El efecto de los antiinflamatorios sobre la proliferación celular se evaluó a corto plazo, 24 y 48 horas. Nos interesaba valorar este efecto en estadios tempranos ya que, como se ha comentado anteriormente son muchas las intervenciones odontológicas que cursan con pérdida de tejido óseo, tejido que conviene recuperar de manera rápida para la posterior rehabilitación oral, como por ejemplo con la colocación de implantes. Si bien, en condiciones de salud, el tejido óseo en si tiene capacidad de regenerarse (Pfeilschifter et al., 1987), nos interesaba conocer en qué medida el empleo de antiinflamatorios en las primeras etapas de cicatrización podrían enlentecer el fenómeno de regeneración ósea.

Según nuestros resultados, el Ibuprofeno y el Paracetamol, a dosis de 5 y 25 μM , disminuyen la proliferación celular *in vitro*, como se puede observar en las tablas 9 y 10 y figuras 11 a 14, siendo esa disminución estadísticamente significativa a las 24 horas de tratamiento en ambos casos. Estos resultados coinciden con los encontrados por otros autores para antiinflamatorios no esteroideos como el Ketorolaco o la Indometacina (Chang, Wang, Tsai, & Ho, 2005; Khokher et al., 1988). Si bien hay autores como Armour y col. que encuentran una proliferación mayor en cultivos tratados con antiinflamatorios en relación a los controles (Armour et al., 2001).

En el caso de la Metilprednisolona también se observó un descenso de la proliferación celular, pero en este caso los resultados fueron estadísticamente significativos tanto a las 24 como 48 horas de incubación. En este caso hay que considerar que el mecanismo de acción dos esteroides es una acción a largo plazo o retarda.

Las células responsables de la formación de matriz ósea son células de origen mesenquimal con capacidad de regeneración, que proliferan y se diferencian a osteoblastos maduros y osteocitos. Cualquier alteración en este proceso puede conducir a la pérdida de hueso y a su consecuente fragilidad. Se ha demostrado que dosis fisiológicas de glucocorticoides promueven la formación de hueso, pero existen muchos estudios que demuestran que dosis suprafisiológicas de determinados glucocorticoides

prolongadas en el tiempo generalmente causan un descenso de la proliferación osteoblástica junto con variaciones en la diferenciación y actividad de esta población celular (Walsh, Jordan, Jefferiss, Stewart, & Beresford, 2001; Leclerc, Noh, Khokhar, Smith, & Frenkel, 2005). Los resultados de este trabajo muestran un claro descenso de la proliferación celular durante las primeras 24-48 horas de tratamiento con Metilprednisolona en comparación con los controles.

Nuestros resultados están en consonancia con distintos estudios que demuestran que la administración de glucocorticoides induce una disminución de la formación ósea y un incremento en la resorción de hueso, lo que resulta en un descenso de la masa mineral ósea en humanos (Fujita et al., 2000; Pearce, Tabensky, Delmas, Baker, & Seeman, 1998). Wang y col. en un estudio realizado en ratas, encontraron que el tratamiento con metilprednisolona durante 4 semanas (a dosis de 0, 2.5, 5, 10 ó 20 mg/kg de peso) provocó un incremento de la densidad de masa ósea, de manera dosis dependiente, a nivel de la metafisis tibial de las ratas (Wang, Ohtsuka-Isoya, Shao, Sakamoto, & Shinoda, 2002). Además también observaron un descenso significativo de marcadores séricos de formación ósea como la osteocalcina o fosfatasa alcalina. Los autores concluyen que este aumento de la densidad ósea no es debido probablemente a un incremento en la formación del hueso sino a una importante reducción de la resorción ósea. Estos resultados coinciden con los de Okazaki et al. (Okazaki et al., 1998) quienes demostraron que la administración de prednisolona previene el descenso en la masa ósea en ratas bloqueando el proceso de resorción y disminuyendo la formación ósea tanto a nivel local como sistémico. King y col. (King, Weir, Gundberg, Fox, & Insogna, 1996) así como Turner y col. (Turner, Hannon, Greene, & Bell, 1995) también concluyeron en sus respectivos estudios que el tratamiento con dexametasona o prednisona incrementaba la masa ósea en ratas sanas o en aquellas que habían sufrido una ovariectomía, lo que podría deberse a la gran supresión de la reabsorción ósea más que al aumento de la formación, como ocurría en el resto de estudios analizados.

Sin embargo, nuestros hallazgos discrepan en parte con los de otros autores como Weinstein y col. (Weinstein, Jilka, Parfitt, & Manolagas, 1998) o O'Brien y col. (O'Brien et al., 2004) quienes describen un doble efecto de la dexametasona, otro fármaco glucocorticoide, sobre los osteoblastos: por una parte durante los 2-3 primeros días de cultivo el fármaco ejerce un efecto potenciador del crecimiento celular; por el

contrario, a más largo plazo, la dexametasona a dosis de 100 nM inhibe la proliferación celular, tanto de osteoblastos como de osteocitos, lo que es justificado por un aumento de la apoptosis celular. En relación con nuestros resultados indicaremos que el glucocorticoide estudiado es otro así como las dosis empleadas.

Nuestros resultados ponen de manifiesto que, si bien ya había sido descrito el efecto de los glucocorticoides sobre el tejido óseo en el sentido de impedir la proliferación y regeneración tisular, la mayoría de los estudios hablan de este efecto tras largos periodos de tratamiento con este tipo de fármacos; en cambio nuestros resultados encuentran un efecto inhibitor en las primeras horas de contacto fármaco-célula ósea. Estos hallazgos pueden tener interés clínico en odontología ya que en ciertos procedimientos quirúrgicos, como tras la extracción de cordales retenidos o la cirugía de colocación de implantes, se suele administrar una dosis de Metilprednisolona para prevenir grandes procesos inflamatorios en el postoperatorio. A la luz de los resultados obtenidos, quizás habría que elegir bien el tipo de fármaco a administrar en estos casos con objeto de evitar esa limitación del crecimiento celular precisamente en los estadios más tempranos de cicatrización tisular, favoreciendo así, bien la regeneración del defecto óseo o la formación de hueso en torno a los implantes dentales que garanticen su posterior osteointegración. No obstante, el efecto observado es más acentuado en tratamientos a más largo plazo (48 horas).

Otro de los objetivos de nuestro trabajo fue determinar el efecto de los antiinflamatorios estudiados sobre el perfil antigénico de los osteoblastos humanos en cultivo, ya que esto creemos que puede guardar relación con el grado de maduración celular y su capacidad funcional.

Dado, que como hemos indicado anteriormente, consideramos que el perfil antigénico mostrado por los osteoblastos guarda relación con la capacidad funcional de esta población, así como, con el grado de maduración celular, el estudio de los antiinflamatorios se ha extendido al análisis de su posible efecto modulador sobre el perfil antigénico de los osteoblastos humanos en cultivo.

Nuestros resultados mostraron que el tratamiento con los distintos antiinflamatorios estudiados (Paracetamol, Ibuprofeno y Metilprednisolona) no produjo

cambios a nivel de los antígenos CD10, CD13 o CD44. Estos datos están en la misma línea de obtenidos en osteoblastos cultivados en presencia de PRP, así como en los descritos previamente por nosotros al tratar células óseas con diferentes biomoléculas, tales como factores de crecimiento (TGF- β 1, FGF-b, PDGF-BB), citoquinas (IL-1 β , IL-2 e IFN- γ) y productos de origen bacteriano como el LPS (Perez, Garcia-Martinez, et al., 2006).

En general hemos observado que los antiinflamatorios estudiados, para todas las dosis ensayadas, no producen un cambio significativo de la expresión de los antígenos implicados en la presentación antigénica (CD54, CD80, CD86 y HLA-DR); en el caso de la Metilprednisolona hay una tendencia a incrementar su expresión pero no llega a ser significativa estadísticamente, lo cual estaría en relación con los datos descritos por Leclerc y col. (Leclerc et al., 2005) quienes describen que los glucocorticoides actúan disminuyendo la síntesis de osteocalcina lo que implicaría el detener el proceso de maduración de esta población, lo cual parece estar relacionado con el incremento en la expresión de marcadores implicados en la presentación antigénica.

Que los antiinflamatorios no ejerzan un papel modulador del perfil antigénico, en parte, garantiza el proceso de maduración y diferenciación de la celular de linaje osteoblástico y por otro ayuda a explicar, que se disminuya la capacidad de crecimiento celular.

Nuestros resultados muestran que el tratamiento con distintas dosis de Ibuprofeno, Paracetamol y Metilprednisolona durante 24 horas no ejerce un efecto significativo a nivel del ciclo celular, no observándose cambios porcentuales en ninguna de las fases cuantificadas.

Con respecto al efecto de ciertos antiinflamatorios sobre el ciclo celular de osteoblastos humanos en cultivo, ciertos autores encuentran que el porcentaje de células en fase G0/G1 en cultivos tratados con Ketorolaco, Diclofenaco o Indometacina (10^{-4} M) fueron significativamente superiores que en los cultivos que no recibieron tratamiento ($p < 0.01$). En cambio, los cultivos que recibieron tratamiento con Piroxicam (10^{-6} M y 10^{-4} M), no mostraron valores estadísticamente significativos con respecto al porcentaje de células en dicha fase. Además el Diclofenaco, el Ketorolaco y la

Indometacina pueden secuestrar a los osteoblastos en fases G0/G1 del ciclo celular de una forma dosis-dependiente. Además, el hecho que los AINES ejerzan un efecto que induce la detención del ciclo celular y muerte de los osteoblastos podría ser un mecanismo importante que contribuya en el efecto supresor de la formación de hueso (Chang et al., 2005).

Los resultados de Chang et al. (Chang et al., 2005) afirman que los AINES suprimen la proliferación celular porque afectan a la regulación del ciclo celular en fase G0 y/o G1, lo que conduce a la muerte celular. Además sugieren que la muerte celular que origina el tratamiento con AINES se debe fundamentalmente a mecanismos de apoptosis más que a mecanismos de necrosis celular. Junto con todos estos resultados se sugiere que las dosis terapéuticas de AINES pueden suprimir la formación y como consecuencia deteriorar el proceso de remodelado óseo mediante alteración del ciclo celular y la inducción de la muerte de osteoblastos. Según estos resultados los efectos de los antiinflamatorios sobre la citotoxicidad y apoptosis de los osteoblastos puede actuar a través de caminos totalmente independientes de las prostaglandinas.

Conviene señalar que los trabajos de Chang y col (Chang et al., 2005) son los únicos encontrados en la bibliografía que estudien el efecto de los antiinflamatorios sobre el ciclo celular de los osteoblastos; si bien, dichos estudios se realizaron en cultivo aislados a partir de muestras de tejido óseo de calvaria de rata.

Si valoramos conjuntamente todos los datos obtenidos en relación con el efecto de los antiinflamatorios sobre los osteoblastos humanos, señalaremos que aunque el Ibuprofeno, el Paracetamol y la Metilprednisolona enlentecen el proceso de regeneración ósea, al disminuir la proliferación celular, por lo que debería utilizarse con limitación en situaciones que requieran una rápida cicatrización de defectos óseos, no hemos observado que se provoque ninguna alteración en otros parámetros fisiológicos de la célula, ya que no se producen grandes cambios a nivel del ciclo celular y perfil antigénico de esta población tras su tratamiento con los mismos a dosis terapéuticas.

VI. CONCLUSIONES

1. Los osteoblastos humanos presentan un perfil antigénico propio, donde se combinan una serie de antígenos constitutivos entre los que se incluye el CD10, CD44 y la fosfatasa alcalina y otros antígenos de expresión débil o variable tales como CD54, CD80, CD86 y HLA-DR.
2. El Plasma Rico en Plaquetas aumenta la capacidad proliferativa del osteoblasto e incrementa la expresión de antígenos implicados en la presentación antigénica (CD54, CD80, CD86 y HLA-DR), sin modular la expresión de los antígenos constitutivos. Estos efectos, unido a que no induce cambios en el ciclo celular que sugieran transformación, presentan al PRP como una alternativa clínica de utilidad para fomentar la regeneración ósea.
3. Los antiinflamatorios Ibuprofeno, Paracetamol y Metilprednisolona, a dosis terapéuticas, disminuyen el crecimiento del osteoblasto sin afectar a otros parámetros celulares como el perfil antigénico o el ciclo celular, por lo que su uso debe ser valorado e incluso limitado en situaciones clínicas que requieran una rápida cicatrización de defectos óseos.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Adcock, I.M., Caramori, G., & Ito, K. (2006). New insights into the molecular mechanisms of corticosteroids actions. *Curr Drug Targets*, 7(6), 649-60.
- Adler, S.C., & Kent, K.J. (2002). Enhancing wound healing with growth factors. *Facial Plast Surg Clin North Am*, 10(2), 129-46.
- Altman, R.D., Latta, L.L., Keer, R., Renfree, K., Hornicek, F.J., & Banovac, K. (1995). Effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs on fracture healing: a laboratory study in rats. *J Orthop Trauma*, 9(5), 392-400.
- Ammann, P., Rizzoli, R., Meyer, J.M., & Bonjour, J.P. (1996). Bone density and shape as determinants of bone strength in IGF-I and/or pamidronate-treated ovariectomized rats. *Osteoporos Int*, 6(3), 219-27.
- Anitua, E. (1999). Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 14(4), 529-35.
- Armour, K.J., van 't Hof, R.J., Armour, K.E., Torbergsen, A.C., Del Soldato, P., & Ralston, S.H. (2001). Inhibition of bone resorption in vitro and prevention of ovariectomy-induced bone loss in vivo by flurbiprofen nitroxybutylester (HCT1026). *Arthritis Rheum*, 44(9), 2185-92.
- Aubin, J.E., Liu, F., Malaval, L., & Gupta, A.K. (1995). Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone*, 17(2 Suppl), 77S-83S.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux C., Davoust, J., Lebeque S., Liu, J., Pulendran, B., & Pulacka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Ann. Rev. Immunol.* 18: 767-811.
- Bannwarth, B., Demotes-Mainard, F., Schaefferbeke, T., & Dehais, J. (1993). Where are peripheral analgesics acting? *Ann Rheum Dis*, 52(1), 1-4.
- Baylink, D.J. (1983). Glucocorticoid-induced osteoporosis. *N Engl J Med*, 309(5), 306-8.
- Baylink, D.J., Finkelman, R.D., & Mohan, S. (1993). Growth factors to stimulate bone formation. *J Bone Miner Res*, 8 Suppl 2, S565-72.
- Beadling, C., & Slifka, M.K. (2006). Regulation of innate and adaptive immune responses by the related cytokines IL-12, IL-23, and IL-27. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 54(1), 15-24.

- Benaroyo, L. (1994). How do we define inflammation?. *Schweiz Rundsch Med Prax*, 83(48), 1343-7.
- Bianco, P., & Boyde, A. (1993). Confocal images of marrow stromal (Westen-Bainton) cells. *Histochemistry*, 100(2), 93-9.
- Boden, S.D., Hair, G., Titus, L., Racine, M., McCuaig, K., Wozney, J.M., & Nanes, M.S. (1997). Glucocorticoid-induced differentiation of fetal rat calvarial osteoblasts is mediated by bone morphogenetic protein-6. *Endocrinology*, 138(7), 2820-8.
- Bost, K., Ramp, W., Nicholson, N., Bento, J., Marriott, I., & Hudson, M. (1999). Staphylococcus aureus infection of mouse or human osteoblasts induces high levels of interleukin-6 and interleukin-12 production. *The Journal of Infections Diseases* 180, 1912-20.
- Boyapati, L., & Wang, H.L. (2006). The Role of Platelet-Rich Plasma in Sinus Augmentation: A Critical Review. *Implant Dent*, 15(2), 160-170.
- Breder, C.D., Dewitt, D., & Kraig, R.P. (1995). Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain. *J Comp Neurol*, 355(2), 296-315.
- Brune, K., & Beck, W.S. (1991). Towards safer nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Agents Actions Suppl*, 32, 13-25.
- Budagian, V., Bulanova, E., Paus, R., & Bulfone-Paus, S. (2006). IL-15/IL-15 receptor biology: a guided tour through an expanding universe. *Cytokine Growth Factor Rev*, 17(4), 259-80.
- Cai, L., Okumu, F.W., Cleland, J.L., Beresini, M., Hogue, D., Lin, Z., & Filvaroff, E.H. (2002). A slow release formulation of insulin as a treatment for osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 10(9), 692-706.
- Camargo, P.M., Lekovic, V., Weinlaender, M., Vasilic, N., Madzarevic, M., & Kenney, E.B. (2002). Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. *J Periodontal Res*, 37(4), 300-6.
- Canalis, E. (1983). Effect of hormones and growth factors on alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in cultured rat calvariae. *Metabolism*, 32(1), 14-20.

- Canalis, E. (1996). Clinical review 83: Mechanisms of glucocorticoid action in bone: implications to glucocorticoid-induced osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab*, 81(10), 3441-7.
- Canalis, E. (2005). Mechanisms of glucocorticoid action in bone. *Curr Osteoporos Rep*, 3(3), 98-102.
- Canalis, E., Economides, A.N., & Gaggero, E. (2003). Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev*, 24(2), 218-35.
- Canalis, E., Pereira, R.C., & Delany, A.M. (2002). Effects of glucocorticoids on the skeleton. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 15 Suppl 5, 1341-5.
- Caplan, A.I. (1994). The mesengenic process. *Clin Plast Surg*, 21(3), 429-35.
- Carlson, N.E., & Roach, R.B. Jr. (2002). Platelet-rich plasma: clinical applications in dentistry. *J Am Dent Assoc*, 133(10), 1383-6.
- Chan, S.Y., & Wong, R.W. (2000). Expression of epidermal growth factor in transgenic mice causes growth retardation. *J Biol Chem*, 275(49), 38693-8.
- Chang, D.J., Ji, C., Kim, K.K., Casinghino, S., McCarthy, T.L., & Centrella, M. (1998). Reduction in transforming growth factor beta receptor I expression and transcription factor Cbfa1 on bone cells by glucocorticoid. *J Biol Chem*, 273(9), 4892-6.
- Chang, J.K., Wang, G.J., Tsai, S.T., & Ho, M.L. (2005). Nonsteroidal anti-inflammatory drug effects on osteoblastic cell cycle, cytotoxicity, and cell death. *Connect Tissue Res*, 46(4-5), 200-10.
- Chaudhary, L.R., & Hruska, K.A. (2001). The cell survival signal Akt is differentially activated by PDGF-BB, EGF, and FGF-2 in osteoblastic cells. *J Cell Biochem*, 81(2), 304-11.
- Chen, D., Zhao, M., & Mundy, G.R. (2004). Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*, 22(4), 233-41.
- Chevalley, T., Rizzoli, R., Manen, D., Caverzasio, J., & Bonjour, J.P. (1998). Arginine increases insulin-like growth factor-I production and collagen synthesis in osteoblast-like cells. *Bone*, 23(2), 103-9.

- Choi, B.H., Zhu, S.J., Kim, B.Y., Huh, J.Y., Lee, S.H., & Jung, J.H. (2005). Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on the viability and proliferation of alveolar bone cells: an in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 34(4), 420-4.
- Cohick, W.S., & Clemmons, D.R. (1993). The insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol*, 55, 131-53.
- Compston, J.E. (2001). Sex steroids and bone. *Physiol Rev*, 81(1), 419-447.
- Connell, L., & McInnes, I.B. (2006). New cytokine targets in inflammatory rheumatic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 20(5), 865-78.
- Cooper, M.S., Hewison, M., & Stewart, P.M. (1999). Glucocorticoid activity, inactivity and the osteoblast. *J Endocrinol*, 163(2), 159-64.
- Cushing, H. (1932). Further Concerning a Parasympathetic Center in the Interbrain: VII. The Effect of Intraventricularly-Injected Histamine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 18(7), 500-10.
- D'Souza, R.N., Aberg, T., Gaikwad, J., Cavender, A., Owen, M., Karsenty, G., & Thesleff, I. (1999). Cbfa1 is required for epithelial-mesenchymal interactions regulating tooth development in mice. *Development*, 126(13), 2911-20.
- David Roodman, G. (2003). Role of stromal-derived cytokines and growth factors in bone metastasis. *Cancer*, 97(3 Suppl), 733-8.
- Davies, J.E. (2000). *Bone engineering*. Ed. EM Squared. Toronto
- Deckers, M.M., Karperien, M., van der Bent, C., Yamashita, T., Papapoulos, S.E., & Lowik, C.W. (2000). Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. *Endocrinology*, 141(5), 1667-74.
- DeGrendele, H.C., Estess, P., Picker, L.J., & Siegelman, M.H. (1996). CD44 and its ligand hyaluronate mediate rolling under physiologic flow: a novel lymphocyte-endothelial cell primary adhesion pathway. *J Exp Med*, 183(3), 1119-30.
- Delany, A.M., Dong, Y., & Canalis, E. (1994). Mechanisms of glucocorticoid action in bone cells. *J Cell Biochem*, 56(3), 295-302.
- Delany, A.M., Jeffrey, J.J., Rydziel, S., & Canalis, E. (1995). Cortisol increases interstitial collagenase expression in osteoblasts by post-transcriptional mechanisms. *J Biol Chem*, 270(44), 26607-12.

- Desbois, C., Hogue, D.A., & Karsenty, G. (1994). The mouse osteocalcin gene cluster contains three genes with two separate spatial and temporal patterns of expression. *J Biol Chem*, 269(2), 1183-90.
- DiCesare, P.E., Nimni, M.E., Peng, L., Yazdi, M., & Cheung, D.T. (1991). Effects of indomethacin on demineralized bone-induced heterotopic ossification in the rat. *J Orthop Res*, 9(6), 855-61.
- Dodds, R.A., Merry, K., Littlewood, A., & Gowen, M. (1994). Expression of mRNA for IL1 beta, IL6 and TGF beta 1 in developing human bone and cartilage. *J Histochem Cytochem*, 42(6), 733-44.
- Dohan, D.M., & Choukroun, J. (2006). PRP, cPRP, PRF, PRG, PRGF, FC, How to find your way in the jungle of platelet concentrates? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*
- Dost, P., Ten Cate, W.J., & Wiemann, M. (2002). Osteoblast-like cell cultures from human stapes. *Acta Otolaryngol*, 122(8), 836-40.
- Ducy, P. (2000). Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn*, 219(4), 461-71.
- Ducy, P., Desbois, C., Boyce, B., Pinero, G., Story, B., Dunstan, C., Smith, E., Bonadio, J., Goldstein, S., Gundberg, C., Bradley, A., & Karsenty, G. (1996). Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature*, 382(6590), 448-52.
- Ducy, P., Starbuck, M., Priemel, M., Shen, J., Pinero, G., Geoffroy, V., Amling, M., & Karsenty, G. (1999). A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev*, 13(8), 1025-36.
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A.L., & Karsenty, G. (1997). Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 89(5), 747-54.
- Eberhart, C.E., Coffey, R.J., Radhika, A., Giardiello, F.M., Ferrenbach, S., & DuBois, R.N. (1994). Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology*, 107(4), 1183-8.
- Engelbrecht, Y., de Wet, H., Horsch, K., Langeveldt, C.R., Hough, F.S., & Hulley, P.A. (2003). Glucocorticoids induce rapid up-regulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and dephosphorylation of extracellular signal-regulated kinase and

impair proliferation in human and mouse osteoblast cell lines. *Endocrinology*, 144(2), 412-22.

Esplugues, J. (1993). *Farmacología en clínica dental*. Ed. Prous Science. Barcelona.

Evans, C.E., & Butcher, C. (2004). The influence on human osteoblasts in vitro of non-steroidal anti-inflammatory drugs which act on different cyclooxygenase enzymes. *J Bone Joint Surg Br*, 86(3), 444-9.

Fennis, J.P., Stoelinga, P.J., & Jansen, J.A. (2002). Mandibular reconstruction: a clinical and radiographic animal study on the use of autogenous scaffolds and platelet-rich plasma. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 31(3), 281-6.

Fennis, J.P., Stoelinga, P.J., & Jansen, J.A. (2004). Mandibular reconstruction: a histological and histomorphometric study on the use of autogenous scaffolds, particulate cortico-cancellous bone grafts and platelet rich plasma in goats. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 33(1), 48-55.

Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil, I., Alobera-Gracia, M.A., del-Canto-Pingarron, M., & Blanco-Jerez, L. (2006). Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 11(2), E151-7.

Ferrara, N. (2000). Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res*, 55, 15-35; discussion 35-6.

Ferreira, C.F., Carriel, M.C., Filho, J.S., Granjeiro, J.M., Oliveira, C.M., Magín, R.S. (2005). Platelet-rich plasma influence on human osteoblasts growth. *Clin Oral Implants Res*, 16(4):456-460

Flórez, J. (2002). *Farmacología humana*. Ed. Masson, S. A. Ediciones Científicas y Técnicas Barcelona. Barcelona.

Fosslien, E. (2000). Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Ann Clin Lab Sci*, 30(1), 3-21.

Fox, S.W., & Lovibond, A.C. (2005). Current insights into the role of transforming growth factor-beta in bone resorption. *Mol Cell Endocrinol*, 243(1-2), 19-26.

Franchi, M., & Schinko, E. (1995). Estrogens and bone metabolism. *Minerva Ginecol*, 47(3), 103-10.

- Froum, S.J., Wallace, S.S., Tarnow, D.P., Cho, S.C. (2002). Effect of platelet-rich plasma on bone growth and osseointegration in human maxillary sinus grafts: three bilateral case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent* 22, 45-53.
- Fujimori, A., Tsutsumi, M., Fukase, M., & Fujita, T. (1989). Cyclooxygenase inhibitors enhance cell growth in an osteoblastic cell line, MC3T3-E1. *J Bone Miner Res*, 4(5), 697-704.
- Fujita, T., Satomura, A., Hidaka, M., Ohsawa, I., Endo, M., & Ohi, H. (2000). Acute alteration in bone mineral density and biochemical markers for bone metabolism in nephrotic patients receiving high-dose glucocorticoid and one-cycle etidronate therapy. *Calcif Tissue Int*, 66(3), 195-9.
- Galandrini, R., De Maria, R., Piccoli, M., Frati, L., & Santoni, A. (1994). CD44 triggering enhances human NK cell cytotoxic functions. *J Immunol*, 153(10), 4399-407.
- Garg, A.K. (2000). The use of platelet-rich plasma to enhance the success of bone grafts around dental implants. *Dent Implantol Update*, 11(3), 17-21.
- Giannoudis, P.V., MacDonald, D.A., Matthews, S.J., Smith, R.M., Furlong, A.J., & De Boer, P. (2000). Nonunion of the femoral diaphysis. The influence of reaming and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Bone Joint Surg Br*, 82(5), 655-8.
- Gillitzer, R., & Goebeler, M. (2001). Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol*, 69(4), 513-21.
- Gimble, J.M., Robinson, C.E., Wu, X., & Kelly, K.A. (1996). The function of adipocytes in the bone marrow stroma: an update. *Bone*, 19(5), 421-8.
- Globus, R.K., Patterson-Buckendahl, P., & Gospodarowicz, D. (1988). Regulation of bovine bone cell proliferation by fibroblast growth factor and transforming growth factor beta. *Endocrinology*, 123(1), 98-105.
- Goldman, A.P., Williams, C.S., Sheng, H., Lamps, L.W., Williams, V.P., Pairet, M., Morrow, J.D., & DuBois, R.N. (1998). Meloxicam inhibits the growth of colorectal cancer cells. *Carcinogenesis*, 19(12), 2195-9.
- Gonshor, A. (2002). Technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate: background and process. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 22(6), 547-57.

- Grey, A.B. (1997). The skeletal effects of primary hyperparathyroidism. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, 11(1), 101-16.
- Groenewegen, G., Buurman, W.A., van der Linden, C.J. (1985). Lymphokine dependence of in vivo expression of MHC class II antigens by endothelium. *Nature* 316: 361-3.
- Gruber, R., Varga, F., Fischer, M.B., & Watzek, G. (2002). Platelets stimulate proliferation of bone cells: involvement of platelet-derived growth factor, microparticles and membranes. *Clin Oral Implants Res*, 13(5), 529-35.
- Gundle, R., Joyner, C.J., & Triffitt, J.T. (1995). Human bone tissue formation in diffusion chamber culture in vivo by bone-derived cells and marrow stromal fibroblastic cells. *Bone*, 16(6), 597-601.
- Gupta, S., Srivastava, M., Ahmad, N., Bostwick, D.G., & Mukhtar, H. (2000). Over-expression of cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma. *Prostate*, 42(1), 73-8.
- Gurlek, A., Pittelkow, M.R., & Kumar, R. (2002). Modulation of growth factor/cytokine synthesis and signaling by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3): implications in cell growth and differentiation. *Endocr Rev*, 23(6), 763-86.
- Gustafsson, J.A., Carlstedt-Duke, J., Poellinger, L., Okret, S., Wikstrom, A.C., Bronnegard, M., Gillner, M., Dong, Y., Fuxe, K., & Cintra, A. (1987). Biochemistry, molecular biology, and physiology of the glucocorticoid receptor. *Endocr Rev*, 8(2), 185-234.
- Hall, F.L., Han, B., Kundu, R.K., Yee, A., Nimni, M.E., & Gordon, E.M. (2001). Phenotypic differentiation of TGF- β 1-responsive pluripotent premesenchymal prehematopoietic progenitor (P4 stem) cells from murine bone marrow. *J Hematother Stem Cell Res*, 10(2), 261-71.
- Hanif, R., Pittas, A., Feng, Y., Koutsos, M.I., Qiao, L., Staiano-Coico, L., Shiff, S.I., & Rigas, B. (1996). Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on proliferation and on induction of apoptosis in colon cancer cells by a prostaglandin-independent pathway. *Biochem Pharmacol*, 52(2), 237-45.

- Harris, R.C., McKanna, J.A., Akai, Y., Jacobson, H.R., Dubois, R.N., & Breyer, M.D. (1994). Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest*, 94(6), 2504-10.
- Hauschka, P.V., Lian, J.B., Cole, D.E., & Gundberg, C.M. (1989). Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev*, 69(3), 990-1047.
- Heinemann, D.E., Lohmann, C., Siggelkow, H., Alves, F., Engel, I., & Koster, G. (2000). Human osteoblast-like cells phagocytose metal particles and express the macrophage marker CD68 in vitro. *J Bone Joint Surg Br*, 82(2), 283-9.
- Hersh, E.V., Lally, E.T., & Moore, P.A. (2005). Update on cyclooxygenase inhibitors: has a third COX isoform entered the fray? *Curr Med Res Opin*, 21(8), 1217-26.
- Hill, P.A., Reynolds, J.J., & Meikle, M.C. (1995). Osteoblasts mediate insulin-like growth factor-I and -II stimulation of osteoclast formation and function. *Endocrinology*, 136(1), 124-31.
- Hirata, T., Ukawa, H., Yamakuni, H., Kato, S., & Takeuchi, K. (1997). Cyclooxygenase isozymes in mucosal ulcerogenic and functional responses following barrier disruption in rat stomachs. *Br J Pharmacol*, 122(3), 447-54.
- Ho, M.L., Chang, J.K., Chuang, L.Y., Hsu, H.K., & Wang, G.J. (1999). Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and prostaglandins on osteoblastic functions. *Biochem Pharmacol*, 58(6), 983-90.
- Ho, M.L., Chang, J.K., & Wang, G.J. (1995). Antiinflammatory drug effects on bone repair and remodeling in rabbits. *Clin Orthop Relat Res*, (313), 270-8.
- Ho, M.L., Chang, J.K., & Wang, G.J. (1998). Effects of ketorolac on bone repair: A radiographic study in modeled demineralized bone matrix grafted rabbits. *Pharmacology*, 57(3), 148-59.
- Hofbauer, L.C., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Spelsberg, T.C., Riggs, B.L., & Khosla, S. (1999). Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone*, 25(3), 255-9.
- Holick, M.F. (1995). Noncalcemic actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and clinical applications. *Bone*, 17(2 Suppl), 107S-111S.

- Horowitz, M. (2003). Matrix proteins versus cytokines in the regulation of osteoblast function and bone formation. *Calcif Tissue Int*, 72(1), 5-7.
- Horton, M.A. (1995). Interactions of connective tissue cells with the extracellular matrix. *Bone*, 17(2 Suppl), 51S-53S.
- Horwitz, M.J., Tedesco, M.B., Gundberg, C., Garcia-Ocana, A., & Stewart, A.F. (2003). Short-term, high-dose parathyroid hormone-related protein as a skeletal anabolic agent for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(2), 569-75.
- Hughes, D.E., Dai, A., Tiffée, J.C., Li, H.H., Mundy, G.R., & Boyce, B.F. (1996). Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat Med*, 2(10), 1132-6.
- Hwang, D., Scollard, D., Byrne, J., & Levine, E. (1998). Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 90(6), 455-60.
- Jensen, T.B., Rahbek, O., Overgaard, S., Soballe, K. (2004). Platelet rich plasma and fresh frozen bone allograft as enhancement of implant fixation. An experimental study in dogs. *J Orthop Res*. 22, 653-8.
- Jilka, R.L. (1998). Cytokines, bone remodeling, and estrogen deficiency: a 1998 update. *Bone*, 23(2), 75-81.
- Kargman, S., Charleson, S., Cartwright, M., Frank, J., Riendeau, D., Mancini, J., Evans, J., & O'Neill, G. (1996). Characterization of Prostaglandin G/H Synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey, and human gastrointestinal tracts. *Gastroenterology*, 111(2), 445-54.
- Karsenty, G. (2000). Role of Cbfa1 in osteoblast differentiation and function. *Semin Cell Dev Biol*, 11(5), 343-6.
- Kassolis, J.D., Rosen, P.S., & Reynolds, M.A. (2000). Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft: case series. *J Periodontol*, 71(10), 1654-61.
- Kawaguchi, H., Pilbeam, C.C., Harrison, J.R., & Raisz, L.G. (1995). The role of prostaglandins in the regulation of bone metabolism. *Clin Orthop Relat Res*, (313), 36-46.

- Keller, J., Bunger, C., Andreassen, T.T., Bak, B., & Lucht, U. (1987). Bone repair inhibited by indomethacin. Effects on bone metabolism and strength of rabbit osteotomies. *Acta Orthop Scand*, 58(4), 379-83.
- Keller, J.C., Trancik, T.M., Young, F.A., & St Mary, E. (1989). Effects of indomethacin on bone ingrowth. *J Orthop Res*, 7(1), 28-34.
- Kenny, A.M., & Raisz, L.G. (2002). Mechanisms of bone remodeling: implications for clinical practice. *J Reprod Med*, 47(1 Suppl), 63-70.
- Kessler, S., Kastler, S., Mayr-Wohlfart, U., Puhl, W., & Gunther, K.P. (2000). Stimulation of primary osteoblast cultures with rh-TGF-beta, rh-bFGF, rh-BMP 2 and rh-BMP 4 in an in vitro model. *Orthopade*, 29(2), 107-11.
- Khokher, M.A., & Dandona, P. (1988). The effect of indomethacin and aspirin on alkaline phosphatase secretion and. *Br J Rheumatol*, 27(4), 291-4.
- Kim, D.H., Yoo, K.H., Choi, K.S., Choi, J., Choi, S.Y., Yang, S.E., Yang, Y.S., Im, H.J., Kim, K.H., Jung, H.L., Sung, K.W., & Koo, H.H. (2005). Gene expression profile of cytokine and growth factor during differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cell. *Cytokine*, 31(2), 119-26.
- Kim, H.J., Yang, J.S., Woo, S.S., Kim, S.K., Yun, C.H., Kim, K.K., & Han, S.H. (2007). Lipoteichoic acid and muramyl dipeptide synergistically induce maturation of human dendritic cells and concurrent expression of proinflammatory cytokines. *J Leukoc Biol*,
- Kim, S.G., Chung, C.H., Kim, Y.K., Park, J.C., & Lim, S.C. (2002). Use of particulate dentin-plaster of Paris combination with/without platelet-rich plasma in the treatment of bone defects around implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 17(1), 86-94.
- King, C.S., Weir, E.C., Gundberg, C.W., Fox, J., & Insogna, K.L. (1996a). Effects of continuous glucocorticoid infusion on bone metabolism in the rat. *Calcif Tissue Int*, 59(3), 184-91.
- Kiuru, J., Viinikka, L., Myllyla, G., Pesonen, K., & Perheentupa, J. (1991). Cytoskeleton-dependent release of human platelet epidermal growth factor. *Life Sci*, 49(26), 1997-2003.

Klaushofer, K., Varga, F., Glantschnig, H., Fratzl-Zelman, N., Czerwenka, E., Leis, H.J., Koller, K., & Peterlik, M. (1995). The regulatory role of thyroid hormones in bone cell growth and differentiation. *J Nutr*, 125(7 Suppl), 1996S-2003S.

Knighton, D.R., Ciresi, K., Fiegel, V.D., Schumerth, S., Butler, E., & Cerra, F. (1990). Stimulation of repair in chronic, nonhealing, cutaneous ulcers using platelet-derived wound healing formula. *Surg Gynecol Obstet*, 170(1), 56-60.

Kohrt, W.M. (2001). Aging and the osteogenic response to mechanical loading. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, 11 Suppl, S137-42.

Kumar, S., Votta, B.J., Rieman, D.J., Badger, A.M., Gowen, M., & Lee, J.C. (2001). IL-1- and TNF-induced bone resorption is mediated by p38 mitogen activated protein kinase. *J Cell Physiol*, 187(3), 294-303.

Lane, N.E., Bauer, D.C., Nevitt, M.C., Pressman, A.R., & Cummings, S.R. (1997). Aspirin and nonsteroidal antiinflammatory drug use in elderly women: effects on a marker of bone resorption. The Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *J Rheumatol*, 24(6), 1132-6.

Langdahl, B.L., Kassem, M., Moller, M.K., & Eriksen, E.F. (1998). The effects of IGF-I and IGF-II on proliferation and differentiation of human osteoblasts and interactions with growth hormone. *Eur J Clin Invest*, 28(3), 176-83.

Langenbach, R., Morham, S.G., Tiano, H.F., Loftin, C.D., Ghanayem, B.I., Chulada, P.C., Mahler, J.F., Lee, C.A., Goulding, E.H., Kluckman, K.D., Kim, H.S., & Smithies, O. (1995). Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. *Cell*, 83(3), 483-92.

Langman, M.J., Weil, J., Wainwright, P., Lawson, D.H., Rawlins, M.D., Logan, R.F., Murphy, M., Vessey, M.P., & Colin-Jones, D.G. (1994). Risks of bleeding peptic ulcer associated with individual non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Lancet*, 343(8905), 1075-8.

Langrish, C.L., McKenzie, B.S., Wilson, N.J., de Waal Malefyt, R., Kastelein, R.A., & Cua, D.J. (2004). IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol Rev*, 202, 96-105.

- LaStayo, P.C., Winters, K.M., & Hardy, M. (2003). Fracture healing: bone healing, fracture management, and current concepts related to the hand. *J Hand Ther*, 16(2), 81-93.
- Leclerc, N., Noh, T., Khokhar, A., Smith, E., & Frenkel, B. (2005). Glucocorticoids inhibit osteocalcin transcription in osteoblasts by suppressing Egr2/Krox20-binding enhancer. *Arthritis Rheum*, 52(3), 929-39.
- Lesley, J., Howes, N., Perschl, A., & Hyman, R. (1994). Hyaluronan binding function of CD44 is transiently activated on T cells during an in vivo immune response. *J Exp Med*, 180 (1), 383-7.
- Lichtenberger, L.M., Wang, Z.M., Romero, J.J., Ulloa, C., Perez, J.C., Giraud, M.N., & Barreto, J.C. (1995). Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) associate with zwitterionic phospholipids: insight into the mechanism and reversal of NSAID-induced gastrointestinal injury. *Nat Med*, 1(2), 154-8.
- Lichtenstein, D.R., Syngal, S., & Wolfe, M.M. (1995). Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the gastrointestinal tract. The double-edged sword. *Arthritis Rheum*, 38(1), 5-18.
- Liu, F., Malaval, L., Gupta, A.K., & Aubin, J.E. (1994). Simultaneous detection of multiple bone-related mRNAs and protein expression during osteoblast differentiation: polymerase chain reaction and immunocytochemical studies at the single cell level. *Dev Biol*, 166(1), 220-34.
- Lohmann, C.H., Schwartz, Z., Koster, G., Jahn, U., Buchhorn, G.H., MacDougall, M.J., Casasola, D., Liu, Y., Sylvia, V.L., Dean, D.D., & Boyan, B.D. (2000). Phagocytosis of wear debris by osteoblasts affects differentiation and local factor production in a manner dependent on particle composition. *Biomaterials*, 21(6), 551-61.
- Lowery, G.L., Kulkarni, S., & Pennisi, A.E. (1999). Use of autologous growth factors in lumbar spinal fusion. *Bone*, 25(2 Suppl), 47S-50S.
- Lozada, J.L., Caplanis, N., Proussaefs, P., Willardsen, J., & Kammeyer, G. (2001). Platelet-rich plasma application in sinus graft surgery: Part I--Background and processing techniques. *J Oral Implantol*, 27(1), 38-42.
- Lucarelli, E., Beccheroni, A., Donati, D., Sangiorgi, L., Cenacchi, A., Del Vento, A. M., Meotti, C., Bertoja, A.Z., Giardino, R., Fornasari, P.M., Mercuri, M. & Picci, P. (2003).

Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. *Biomaterials* 24, 3095-100.

Lynch, S.E. (1991). Interactions of growth factors in tissue repair. *Prog Clin Biol Res*, 365, 341-57.

Majumdar, M.K., Keane-Moore, M., Buyaner, D., Hardy, W.B., Moorman, M.A., McIntosh, K.R., & Mosca, J.D. (2003). Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci.* 10, 228-41.

Malaval, L., Modrowski, D., Gupta, A.K., & Aubin, J.E. (1994). Cellular expression of bone-related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures. *J Cell Physiol*, 158(3), 555-72.

Man, D., Plosker, H., & Winland-Brown, J.E. (2001). The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. *Plast Reconstr Surg*, 107(1), 229-37; discussion 238-9.

Manolagas, S.C. (2000). Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*, 21(2), 115-37.

Martinez, P., Esbrit, P., Rodrigo, A., Alvarez-Arroyo, M.V., & Martinez, M.E. (2002). Age-related changes in parathyroid hormone-related protein and vascular endothelial growth factor in human osteoblastic cells. *Osteoporos Int*, 13(11), 874-81.

Martinovic, S., Borovecki, F., Miljavac, V., Kisic, V., Maticic, D., Francetic, I., & Vukicevic, S. (2006). Requirement of a bone morphogenetic protein for the maintenance and stimulation of osteoblast differentiation. *Arch Histol Cytol*, 69(1), 23-36.

Marx, J. (1995). How the glucocorticoids suppress immunity. *Science*, 270(5234), 232-3.

Marx, R.E. (2001). Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent*, 10(4), 225-8.

Marx R.E. (2000). Platelet concentrate: a strategy for accelerating and improving bone regeneration. In Davies J.E. *Bone engineerin*. Ed. Em Squared. Toronto. 447-53.

- Marx, R.E. (2004). Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg*, 62(4), 489-96.
- Marx, R.E., Carlson, E.R., Eichstaedt, R.M., Schimmele, S.R., Strauss, J.E., & Georgeff, K.R. (1998). Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 85(6), 638-46.
- Matras, H. (1970). [Effect of various fibrin preparations on reimplantations in the rat skin]. *Osterr Z Stomatol*, 67(9), 338-59.
- McCormack, K., & Brune, K. (1991). Dissociation between the antinociceptive and anti-inflammatory effects of the nonsteroidal anti-inflammatory drugs. A survey of their analgesic efficacy. *Drugs*, 41(4), 533-47.
- Mehlich, D.R., Markenson, J., & Schnitzer, T.J. (1999). The Efficacy of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs for Acute Pain. *Cancer Control*, 6(2 Suppl 1), 5-9.
- Miyake, K., Underhill, C.B., Lesley, J., & Kincade, P.W. (1990). Hyaluronate can function as a cell adhesion molecule and CD44 participates in hyaluronate recognition. *J Exp Med*, 172(1), 69-75.
- Miyazono, K., & Takaku, F. (1989). Platelet-derived growth factors. *Blood Rev*, 3(4), 269-76.
- Montes, M.J., Aleman, P., Garcia-Tortosa, C., Borja, C., Ruiz, C., & Garcia-Olivares, E. (1996). Cultured human decidual stromal cells express antigens associated with hematopoietic cells. *J Reprod Immunol*, 30(1), 53-66.
- Mori, S., Jee, W.S., Li, X.J., Chan, S., & Kimmel, D.B. (1990). Effects of prostaglandin E2 on production of new cancellous bone in the axial skeleton of ovariectomized rats. *Bone*, 11(2), 103-13.
- Morton, D.J., Barrett-Connor, E.L., & Schneider, D.L. (1998). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and bone mineral density in older women: the Rancho Bernardo study. *J Bone Miner Res*, 13(12), 1924-31.
- Mott, D.A., Mailhot, J., Cuenin, M.F., Sharawy, M., & Borke, J. (2002). Enhancement of osteoblast proliferation in vitro by selective enrichment of demineralized freeze-dried bone allograft with specific growth factors. *J Oral Implantol*, 28(2), 57-66.

- Mucci, A., Varesio, L., Neglia, R., Colombari, B., Pastorino, S., & Blasi, E. (2003). Antifungal activity of macrophages engineered to produce IFN γ : inducibility by picolinic acid. *Med Microbiol Immunol (Berl)*, 192, 71-8.
- Mundy, G.R., Boyce, B., Hughes, D., Wright, K., Bonewald, L., Dallas, S., Harris, S., Ghosh-Choudhury, N., Chen, D., Dunstan, C., & et, a.l. (1995). The effects of cytokines and growth factors on osteoblastic cells. *Bone*, 17(2 Suppl), 71S-75S.
- Muscara, M.N., McKnight, W., Asfaha, S., & Wallace, J.L. (2000). Wound collagen deposition in rats: effects of an NO-NSAID and a selective COX-2 inhibitor. *Br J Pharmacol*, 129(4), 681-6.
- Nakaura, H., Kenmotsu, S., Sakai, H., & Ozawa H (1995). Localization of CD44, the hyaluronate receptor, on the plasma membrana of osteocytes and osteoclasts in rat tibiae. *Cell Tissue Res*. 280: 225-33.
- Naruse, T., Nishida, Y., Hosono, K., & Ishiguro, N. (2006). Meloxicam inhibits osteosarcoma growth, invasiveness and metastasis by COX-2-dependent and independent routes. *Carcinogenesis*, 27(3), 584-92.
- Nash, T.J., Howlett, C.R., Martin, C., Steele, J., Johnson, K.A., & Hicklin, D.J. (1994). Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits. *Bone*, 15(2), 203-8.
- Nasu, M., Sugimoto, T., Kaji, H., & Chihara, K. (2000). Estrogen modulates osteoblast proliferation and function regulated by parathyroid hormone in osteoblastic SaOS-2 cells: role of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-5. *J Endocrinol*, 167(2), 305-13.
- Norman, A.W., Bishop, J.E., Collins, E.D., Seo, E.G., Satchell, D.P., Dormanen, M.C., Zanello, S.B., Farach-Carson, M.C., Bouillon, R., & Okamura, W.H. (1996). Differing shapes of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ function as ligands for the D-binding protein, nuclear receptor and membrane receptor: a status report. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 56(1-6 Spec No), 13-22.
- Norrdin, R.W., Jee, W.S., & High, W.B. (1990). The role of prostaglandins in bone in vivo. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 41(3), 139-49.

- Noth, U., Osyczka, A.M., Tuli, R., Hickok, N.J., Danielson, K.G., & Tuan, R.S. (2002). Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J Orthop Res*, 20(5), 1060-9.
- O'Brien, C.A., Jia, D., Plotkin, L.I., Bellido, T., Powers, C.C., Stewart, S.A., Manolagas, S.C., & Weinstein, R.S. (2004). Glucocorticoids act directly on osteoblasts and osteocytes to induce their apoptosis and reduce bone formation and strength. *Endocrinology*, 145(4), 1835-41.
- Oelkers, W. (1996). Adrenal insufficiency. *N Engl J Med*, 335(16), 1206-12.
- Offenbacher, S., Heasman, P.A., & Collins, J.G. (1993). Modulation of host PGE2 secretion as a determinant of periodontal disease expression. *J Periodontol*, 64(5 Suppl), 432-44.
- Ogston, N., Harrison, A.J., Cheung, H.F., Ashton, B.A., & Hampson, G. (2002). Dexamethasone and retinoic acid differentially regulate growth and differentiation in an immortalised human clonal bone marrow stromal cell line with osteoblastic characteristics. *Steroids*, 67(11), 895-906.
- Ogino, Y., Ayukawa, Y., Tsukiyama, Y., & Koyano, K. (2005). The effect of platelet-rich plasma on the cellular response of rat bone marrow cells in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 100, 302-7.
- Ohshiba, T., Miyaura, C., & Ito, A. (2003). Role of prostaglandin E produced by osteoblasts in osteolysis due to bone metastasis. *Biochem Biophys Res Commun*, 300(4), 957-64.
- Okamoto, M., Murai, J., Yoshikawa, H., & Tsumaki, N. (2006). Bone morphogenetic proteins in bone stimulate osteoclasts and osteoblasts during bone development. *J Bone Miner Res*, 21(7), 1022-33.
- Okazaki, Y., Tsurukami, H., Nishida, S., Okimoto, N., Aota, S., Takeda, S., & Nakamura, T. (1998). Prednisolone prevents decreases in trabecular bone mass and strength by reducing bone resorption and bone formation defect in adjuvant-induced arthritic rats. *Bone*, 23(4), 353-60.
- Onyia, J.E., Bidwell, J., Herring, J., Hulman, J., & Hock, J.M. (1995). In vivo, human parathyroid hormone fragment (hPTH 1-34) transiently stimulates immediate early

response gene expression, but not proliferation, in trabecular bone cells of young rats. *Bone*, 17(5), 479-84.

Orfao, A. (1995). *La citometría de flujo en el laboratorio clínico*. Ed. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. España.

Ormerod, M.G. (2000). *Flow cytometry: a practical approach*. Ed. Oxford University Press. Oxford.

Pascher, E., Perniok, A., Becker, A., & Feldkamp, J. (1999). Effect of 1alpha,25(OH)₂-vitamin D₃ on TNF alpha-mediated apoptosis of human primary osteoblast-like cells in vitro. *Horm Metab Res*, 31(12), 653-6.

Pearce, G., Tabensky, D.A., Delmas, P.D., Baker, H.W., & Seeman, E. (1998). Corticosteroid-induced bone loss in men. *J Clin Endocrinol Metab*, 83(3), 801-6.

Perez, E., Garcia-Martinez, O., Arroyo-Morales, M., Reyes-Botella, C., & Ruiz, C. (2006). Modulation of Antigenic Phenotype in Cultured Human Osteoblast-like Cells by FGFb, TGFbeta1, PDGF-BB, IL-2, IL-1beta, LPS and IFNgamma. *Biosci Rep*, 26(4), 281-9.

Pfeilschifter, J., & Mundy, G.R. (1987). Modulation of type beta transforming growth factor activity in bone cultures by osteotropic hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(7), 2024-8.

Pfeilschifter, J., Oechsner, M., Naumann, A., Gronwald, R.G., Minne, H.W., & Ziegler, R. (1990). Stimulation of bone matrix apposition in vitro by local growth factors: a comparison between insulin-like growth factor I, platelet-derived growth factor, and transforming growth factor beta. *Endocrinology*, 127(1), 69-75.

Piazza, G.A., Rahm, A.K., Finn, T.S., Fryer, B.H., Li, H., Stoumen, A.L., Pamukcu, R., & Ahnen, D.J. (1997). Apoptosis primarily accounts for the growth-inhibitory properties of sulindac metabolites and involves a mechanism that is independent of cyclooxygenase inhibition, cell cycle arrest, and p53 induction. *Cancer Res*, 57(12), 2452-9.

Pierce, G.F., Tarpley, J.E., Yanagihara, D., Mustoe, T.A., Fox, G.M., & Thomason, A. (1992). Platelet-derived growth factor (BB homodimer), transforming growth factor-beta 1, and basic fibroblast growth factor in dermal wound healing. Neovessel and matrix formation and cessation of repair. *Am J Pathol*, 140(6), 1375-88.

- Pilbeam, C.C., Raisz, L.G., Voznesensky, O., Alander, C.B., Delman, B.N., & Kawaguchi, H. (1995). Autoregulation of inducible prostaglandin G/H synthase in osteoblastic cells by prostaglandins. *J Bone Miner Res*, 10(3), 406-14.
- Platt, J.L., LeBien, T.W., & Michael, A.F. (1983). Stages of renal ontogenesis identified by monoclonal antibodies reactive with lymphohemopoietic differentiation antigens. *J Exp Med*, 157(1), 155-72.
- Poirier, J. (1985). Cuadernos de histología. Ed. Marban. Librería Médica. 79-102.
- Qiao, L., Hanif, R., Sphicas, E., Shiff, S.J., & Rigas, B. (1998). Effect of aspirin on induction of apoptosis in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Biochem Pharmacol*, 55(1), 53-64.
- Quinn, J.M., Itoh, K., Udagawa, N., Hausler, K., Yasuda, H., Shima, N., Mizuno, A., Higashio, K., Takahashi, N., Suda, T., Martin, T.J., & Gillespie, M.T. (2001). Transforming growth factor beta affects osteoclast differentiation via direct and indirect actions. *J Bone Miner Res*, 16(10), 1787-94.
- Rahman, M.A., Dhar, D.K., Masunaga, R., Yamanoi, A., Kohno, H., & Nagasue, N. (2000). Sulindac and exisulind exhibit a significant antiproliferative effect and induce apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer Res*, 60(8), 2085-9.
- Ratka, A., Sutanto, W., Bloemers, M., & de Kloet, E.R. (1989). On the role of brain mineralocorticoid (type I) and glucocorticoid (type II) receptors in neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology*, 50(2), 117-23.
- Reyes-Botella, C., Montes, M.J., Abadia-Molina, A.C., Vallecillo-Capilla, M.F., & Ruiz, C. (1999). CD10 expression in cultured human osteoblast-like cells. *Folia Biol (Praha)*, 45(6), 257-60.
- Reyes-Botella, C., Montes, M.J., Vallecillo-Capilla, M.F., Olivares, E.G., & Ruiz, C. (2000). Expression of molecules involved in antigen presentation and T cell activation (HLA-DR, CD80, CD86, CD44 and CD54) by cultured human osteoblasts. *J Periodontol*, 71(4), 614-7.
- Reyes-Botella, C., Montes, M.J., Vallecillo-Capilla, M.F., Olivares, E.G., & Ruiz, C. (2002). Antigenic phenotype of cultured human osteoblast-like cells. *Cell Physiol Biochem*, 12(5-6), 359-64.

- Reyes-Botella, C., Vallecillo-Capilla, M.F., & Ruiz, C. (2002). Effect of different growth factors on human cultured osteoblast-like cells. *Cell Physiol Biochem*, 12(5-6), 353-8.
- Rickard, D.J., Waters, K.M., Ruesink, T.J., Khosla, S., Katzenellenbogen, J.A., Katzenellenbogen, B.S., Riggs, B.L., & Spelsberg, T.C. (2002) Estrogen receptor isoform-specific induction of progesterone receptors in human osteoblasts. *J Bone Miner Res*, 17(4), 580-92.
- Rocha, e. Silva M. (1978). A brief survey of the history of inflammation. *Agents Actions*, 8(1-2), 45-9.
- Roldan, J.C., Jepsen, S., Miller, J., Freitag, S., Rueger, D.C., Acil, Y., & Terheyden, H. (2004). Bone formation in the presence of platelet-rich plasma vs. bone morphogenetic protein-7. *Bone*, 34(1), 80-90.
- Romanovsky, A.A., Almeida, M.C., Aronoff, D.M., Ivanov, A.I., Konsman, J.P., Steiner, A.A., & Turek, V.F. (2005). Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions. *Front Biosci*, 10, 2193-216.
- Romas, E., Gillespie, M.T., & Martin, T.J. (2002). Involvement of receptor activator of NFkappaB ligand and tumor necrosis factor-alpha in bone destruction in rheumatoid arthritis. *Bone*, 30(2), 340-6.
- Romas, E., Udagawa, N., Zhou, H., Tamura, T., Saito, M., Taga, T., Hilton, D.J., Suda, T., Ng, K.W., & Martin, T.J. (1996). The role of gp130-mediated signals in osteoclast development: regulation of interleukin 11 production by osteoblasts and distribution of its receptor in bone marrow cultures. *J Exp Med*, 183(6), 2581-91.
- Rubin, M.R., & Bilezikian, J.P. (2002). Clinical review 151: The role of parathyroid hormone in the pathogenesis of glucocorticoid-induced osteoporosis: a re-examination of the evidence. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(9), 4033-41.
- Ruiz, C., Perez, E., Vallecillo-Capilla, M., & Reyes-Botella, C. (2003). Phagocytosis and allogeneic T cell stimulation by cultured human osteoblast-like cells. *Cell Physiol Biochem*, 13(5), 309-14.
- Samad, T., & Abdi, S. (2001). Cyclooxygenase-2 and antagonists in pain management. *Curr Opin Anaesthesiol*, 14(5), 527-32.

- Schafer, A.I. (1995). Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on platelet function and systemic hemostasis. *J Clin Pharmacol*, 35(3), 209-19.
- Schilephake, H. (2002). Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 31(5), 469-84.
- Schlegel, K.A., Kloss, F.R., Schultze-Mosgau, S., Neukam, F.W., & Wiltfang, J. (2003). Osseous defect regeneration using autogenous bone alone or combined with Biogran or Aligpore with and without added thrombocytes. A microradiologic evaluation. *Mund Kiefer Gesichtschir*, 7(2), 112-8.
- Schmitz, J.P. & Hollinger, J.O. (2001). The biology of platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg*, 59, 1119-21.
- Schrum, L.W., Bost, K.L., Hudson, M.C., & Marriott, I. (2003). Bacterial infection induces expression of functional MHC class II molecules in murine and human osteoblasts. *Bone*, 33(5), 812-21.
- Schrum, L.W., Marriott, I., Butler, B.R., Thomas, E.K., Hudson, M.C., & Bost, K.L. (2003). Functional CD40 expression induced following bacterial infection of mouse and human osteoblasts. *Infect Immun*, 71(3), 1209-16.
- Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K., Hauser, S., Masferrer, J., & Isakson, P. (1997). Distribution of COX-1 and COX-2 in normal and inflamed tissues. *Adv Exp Med Biol*, 400A, 167-70.
- Seino, K., Azuma, M., Bashuda, H., Fukao, K., Yagita, H., & Okumura, K. (1995). CD86 (B70/B7-2) on endothelial cells co-stimulates allogeneic CD4+ T cells. *Int Immunol*, 7(8), 1331-7.
- Shaiegan, M., Pourfatollah, A.A., Namiri, M., & Babae, G. (2006). Generation of IL-8 and TNF-alpha in platelet concentrates during storage. *Arch Iran Med*, 9(1), 61-4.
- Shalhoub, V., Conlon, D., Tassinari, M., Quinn, C., Partridge, N., Stein, G.S., & Lian, J.B. (1992). Glucocorticoids promote development of the osteoblast phenotype by selectively modulating expression of cell growth and differentiation associated genes. *J Cell Biochem*, 50(4), 425-40.
- Shanaman, R., Filstein, M.R. & Danesh-Meyer, M.J. (2001). Localized ridge augmentation using GBR and platelet-rich plasma: case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 21, 345-55.

- Sheng, H., Shao, J., Kirkland, S.C., Isakson, P., Coffey, R.J., Morrow, J., Beauchamp, R.D., & DuBois, R.N. (1997). Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest*, 99(9), 2254-9.
- Shiff, S.J., Koutsos, M.I., Qiao, L., & Rigas, B. (1996). Nonsteroidal antiinflammatory drugs inhibit the proliferation of colon adenocarcinoma cells: effects on cell cycle and apoptosis. *Exp Cell Res*, 222(1), 179-88.
- Smith, W.L., DeWitt, D.L., & Garavito, R.M. (2000). Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem*, 69, 145-82.
- Sonnleitner, D., Huemer, P., & Sullivan, D.Y. (2000). A simplified technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate for intraoral bone grafting techniques: a technical note. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 15(6), 879-82.
- Spiro, H.M. (1983). Is the steroid ulcer a myth? *N Engl J Med*, 309(1), 45-7.
- Sporn, M.B., & Roberts, A.B. (1988). Peptide growth factors are multifunctional. *Nature*, 332(6161), 217-9.
- Stanislaus, D., Yang, X., Liang, J.D., Wolfe, J., Cain, R.L., Onyia, J.E., Falla, N., Marder, P., Bidwell, J.P., Queener, S.W., & Hock, J.M. (2000). In vivo regulation of apoptosis in metaphyseal trabecular bone of young rats by synthetic human parathyroid hormone (1-34) fragment. *Bone*, 27(2), 209-18.
- Stanley, K.T., VanDort, C., Motyl, C., Endres, J., & Fox, D.A. (2006). Immunocompetent properties of human osteoblasts: interactions with T lymphocytes. *J Bone Miner Res*, 21(1), 29-36.
- Stein, G.S., & Lian, J.B. (1993). Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr Rev*, 14(4), 424-42.
- Stein, G.S., Lian, J.B., Stein, J.L., Van Wijnen, A.J., & Montecino, M. (1996). Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. *Physiol Rev*, 76(2), 593-629.
- Steinbrink, K., Paragnik, L., Jonuleit, H., Tuting, T., Knop, J., & Enk, A.H. (2000). Induction of dendritic cell maturation and modulation of dendritic cell-induced immune responses by prostaglandins. *Arch Dermatol Res*, 292(9), 437-45.

- Stewart, C.E., & Rotwein, P. (1996). Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol Rev*, 76(4), 1005-26.
- Takayanagi, H. (2005). Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. *J Periodontal Res*, 40(4), 287-93.
- Takayanagi, H., Kim, S., & Taniguchi, T. (2002). Signaling crosstalk between RANKL and interferons in osteoclast differentiation. *Arthritis Res*, 4 Suppl 3, S227-32.
- Takigawa, M., Nakanishi, T., Kubota, S., & Nishida, T. (2003). Role of CTGF/HCS24/ecogenin in skeletal growth control. *J Cell Physiol*, 194(3), 256-66.
- Terai, M., Kohno, Y., Namba, M., Umemiya, T., Niwa, K., Nakajima, H. & Mikata, A. (1990). Class II major histocompatibility antigen expression on coronary arterial endothelium in a patient with Kawasaki disease. *Hum Pathol*. 21, 231-4.
- Thun, M.J., Henley, S.J., & Patrono, C. (2002). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J Natl Cancer Inst*, 94(4), 252-66.
- Tjandrawinata, R.R., Dahiya, R., & Hughes-Fulford, M. (1997). Induction of cyclooxygenase-2 mRNA by prostaglandin E2 in human prostatic carcinoma cells. *Br J Cancer*, 75(8), 1111-8.
- Tornkvist, H., & Lindholm, T.S. (1980). Effect of ibuprofen on mass and composition of fracture callus and bone. An experimental study on adult rat. *Scand J Rheumatol*, 9(3), 167-71.
- Tozum, T.F. & Demiralp, B. (2003). Platelet-rich plasma: a promising innovation in dentistry. *J Can Dent Assoc*. 69, 664.
- Tresguerres, J.A.F. (2006). *Fisiología humana*. Ed. Mc Graw Hill-Interamericana de España. Madrid.
- Trinchieri, G., & Gerosa, F. (1996). Immunoregulation by interleukin-12. *J Leukoc Biol* 59(4), 505-11.
- Tsubouchi, Y., Mukai, S., Kawahito, Y., Yamada, R., Kohno, M., Inoue, K., & Sano, H. (2000). Meloxicam inhibits the growth of non-small cell lung cancer. *Anticancer Res*, 20(5A), 2867-72.

- Tullberg-Reinert, H., & Jundt, G. (1999). In situ measurement of collagen synthesis by human bone cells with a sirius red-based colorimetric microassay: effects of transforming growth factor beta2 and ascorbic acid 2-phosphate. *Histochem Cell Biol*, 112(4), 271-6.
- Turner, R.T., Hannon, K.S., Greene, V.S., & Bell, N.H. (1995a). Prednisone inhibits formation of cortical bone in sham-operated and ovariectomized female rats. *Calcif Tissue Int*, 56(4), 311-5.
- Turner, R.T., Hannon, K.S., Greene, V.S., & Bell, N.H. (1995b). Prednisone inhibits formation of cortical bone in sham-operated and ovariectomized female rats. *Calcif Tissue Int*, 56(4), 311-5.
- Underhill, C.B. (1993). Hyaluronan is inversely correlated with the expression of CD44 in the dermal condensation of the embryonic hair follicle. *J Invest Dermatol*, 101(6), 820-6.
- van Everdingen, A.A., Siewertsz van Reesema, D.R., Jacobs, J.W., & Bijlsma, J.W. (2003). Low-dose glucocorticoids in early rheumatoid arthritis: discordant effects on bone mineral density and fractures? *Clin Exp Rheumatol*, 21(2), 155-60.
- van Staa, T.P., Leufkens, H.G., Abenhaim, L., Begaud, B., Zhang, B., & Cooper, C. (2000). Use of oral corticosteroids in the United Kingdom. *QJM*, 93(2), 105-11.
- van Staa, T.P., Leufkens, H.G., Abenhaim, L., Zhang, B., & Cooper, C. (2000). Oral corticosteroids and fracture risk: relationship to daily and cumulative doses. *Rheumatology (Oxford)*, 39(12), 1383-9.
- van Staa, T.P., Leufkens, H.G., & Cooper, C. (2000). Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of fractures. *Bone*, 27(4), 563-8.
- Vermes, C., Roebuck, K.A., Chandrasekaran, R., Dobai, J.G., Jacobs, J.J., & Glant, T.T. (2000). Particulate wear debris activates protein tyrosine kinases and nuclear factor kappaB, which down-regulates type I collagen synthesis in human osteoblasts. *J Bone Miner Res*, 15(9), 1756-65.
- Villa, I., Dal Fiume, C., Maestroni, A., Rubinacci, A., Ravasi, F., & Guidobono, F. (2003). Human osteoblast-like cell proliferation induced by calcitonin-related peptides involves PKC activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 284(3), E627-33.

Villareal, M.S., Klaustermeyer, W.B., Hahn, T.J., & Gordon, E.H. (1996). Osteoporosis in steroid-dependent asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 76(4), 369-72.

Wada, M.R., Inagawa-Ogashiwa, M., Shimizu, S., Yasumoto, S., & Hashimoto, N. (2002). Generation of different fates from multipotent muscle stem cells. *Development*, 129(12), 2987-95.

Walker, L.M., Preston, M.R., Magnay, J.L., Thomas, P.B., & El Haj, A.J. (2001). Nicotinic regulation of c-fos and osteopontin expression in human-derived osteoblast-like cells and human trabecular bone organ culture. *Bone*, 28(6), 603-8.

Wallace, J.L. (2000). How do NSAIDs cause ulcer disease? *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 14(1), 147-59.

Wallace, J.L., McKnight, W., Reuter, B.K., & Vergnolle, N. (2000). NSAID-induced gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. *Gastroenterology*, 119(3), 706-14.

Wallace, S.S., & Froum, S.J. (2003). Effect of maxillary sinus augmentation on the survival of endosseous dental implants. A systematic review. *Ann Periodontol*, 8(1), 328-43.

Walsh, S., Jefferiss, C., Stewart, K., Jordan, G.R., Screen, J., & Beresford, J.N. (2000). Expression of the developmental markers STRO-1 and alkaline phosphatase in cultures of human marrow stromal cells: regulation by fibroblast growth factor (FGF)-2 and relationship to the expression of FGF receptors 1-4. *Bone*, 27(2), 185-95.

Walsh, S., Jordan, G.R., Jefferiss, C., Stewart, K., & Beresford, J.N. (2001). High concentrations of dexamethasone suppress the proliferation but not the differentiation or further maturation of human osteoblast precursors in vitro: relevance to glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rheumatology (Oxford)*, 40(1), 74-83.

Wang, J.L., Lin, K.L., Chen, J.S., Lu, Y.C., Jiann, B.P., Chang, H.T., Hsu, S.S., Chen, W.C., Huang, J.K., Ho, C.M., & Jan, C.R. (2004). Effect of celecoxib on Ca²⁺ movement and cell proliferation in human osteoblasts. *Biochem Pharmacol*, 67(6), 1123-30.

Wang, Y., Ohtsuka-Isoya, M., Shao, P., Sakamoto, S., & Shinoda, H. (2002). Effects of methylprednisolone on bone formation and resorption in rats. *Jpn J Pharmacol*, 90(3), 236-46.

- Warner, T.D., Giuliano, F., Vojnovic, I., Bukasa, A., Mitchell, J.A., & Vane, J.R. (1999). Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(13), 7563-8.
- Watkins, D.N., Lenzo, J.C., Segal, A., Garlepp, M.J., & Thompson, P.J. (1999). Expression and localization of cyclo-oxygenase isoforms in non-small cell lung cancer. *Eur Respir J*, 14(2), 412-8.
- Weinstein, R.S., Jilka, R.L., Parfitt, A.M., & Manolagas, S.C. (1998). Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest*, 102(2), 274-82.
- Weir, E.C., Lowik, C.W., Paliwal, I., & Insogna, K.L. (1996). Colony stimulating factor-1 plays a role in osteoclast formation and function in bone resorption induced by parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein. *J Bone Miner Res*, 11(10), 1474-81.
- Werner, M.F., Souza, G.E., & Zampronio, A.R. (2006). Nimesulide-induced antipyresis in rats involves both cyclooxygenase-dependent and independent mechanisms. *Eur J Pharmacol*, 543(1-3), 181-9.
- Whitman, D.H., Berry, R.L., & Green, D.M. (1997). Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg*, 55(11), 1294-9.
- Whittle, B.J. (1980). Role of prostaglandins in the defense of the gastric mucosa. *Brain Res Bull*, 5 Suppl 1, 7-14.
- Wiltfang, J., Kloss, F.R., Kessler, P., Nkenke, E., Schultze-Mosgau, S., Zimmermann, R., & Schlegel, K.A. (2004). Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects. An animal experiment. *Clin Oral Implants Res*, 15(2), 187-93.
- Wolfesberger, B., Walter, I., Hoelzl, C., Thalhammer, J.G., & Egerbacher, M. (2006). Antineoplastic effect of the cyclooxygenase inhibitor meloxicam on canine osteosarcoma cells. *Res Vet Sci*, 80(3), 308-16.

- Yamaguchi, A., Komori, T., & Suda, T. (2000). Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev*, 21(4), 393-411.
- Yang, D., Jin, D., Chen, J., Jing, Z., & Wu, D. (2000). Modulation of transforming growth factor beta to platelet-derived growth factor receptor-alpha of human osteoblasts. *Chin Med J (Engl)*, 113(7), 621-4.
- Yao, M., Kargman, S., Lam, E.C., Kelly, C.R., Zheng, Y., Luk, P., Kwong, E., Evans, J.F., & Wolfe, M.M. (2003). Inhibition of cyclooxygenase-2 by rofecoxib attenuates the growth and metastatic potential of colorectal carcinoma in mice. *Cancer Res*, 63(3), 586-92.
- Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K., Udagawa, N., Takahashi, N., & Suda, T. (1998). Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(7), 3597-602.
- Yates, A.J., Oreffo, R.O., Mayor, K., & Mundy, G.R. (1991). Inhibition of bone resorption by inorganic phosphate is mediated by both reduced osteoclast formation and decreased activity of mature osteoclasts. *J Bone Miner Res*, 6(5), 473-8.
- Young, M.F. (2003). Bone matrix proteins: more than markers. *Calcif Tissue Int*, 72(1), 2-4.
- Zaidi, M. (1990). "Calcium receptors" on eukaryotic cells with special reference to the osteoclast. *Biosci Rep*, 10(6), 493-507.
- Zhang, G., Tu, C., Zhang, G., Zhou, G., & Zheng, W. (2000). Indomethacin induces apoptosis and inhibits proliferation in chronic myeloid leukemia cells. *Leuk Res*, 24(5), 385-92.