

**DEPARTAMENTO DE ENFERMERÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS FEDERICO OLORIZ**



**TESIS DOCTORAL**

**EFFECTO DE LOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS  
SOBRE EL OSTEOLASTO: DETERMINACIÓN DEL  
MECANISMO DE ACCIÓN.**

**M<sup>a</sup> Elvira De Luna Bertos**

**Universidad de Granada, 2012**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: M<sup>a</sup> Elvira de Luna Bertos  
D.L.: GR 2195-2012  
ISBN: 978-84-9028-098-0

**La memoria de Tesis Doctoral que lleva por título: EFECTO DE LOS ANTIINFLAMARIOS SOBRE EL OSTEOLASTO: DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN, ha sido presentada por la Licenciada MARIA ELVIRA DE LUNA BERTOS para aspirar a grado de Doctor, bajo la dirección de Dña. CONCEPCIÓN RUIZ RODRÍGUEZ y la codirección de Dña. OLGA GARCÍA MARTÍNEZ y Dña. LOURDES DÍAZ RODRÍGUEZ.**

**Fdo. M<sup>a</sup> Elvira De Luna Bertos**

**Dra. CONCEPCIÓN RUIZ RODRÍGUEZ, Catedrática de Universidad del Departamento de Enfermería de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Granada.**

**CERTIFICA:**

**Que Dña. M<sup>a</sup> ELVIRA DE LUNA BERTOS, Licenciada en Antropología Social y Cultural, ha realizado bajo mi dirección y tutela el Trabajo de Tesis Doctoral, sobre el tema: EFECTO DE LOS ANTIINFLAMARIOS SOBRE EL OSTEOLASTO: DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN, y cuenta con mi aprobación para ser presentada, a fin de obtener el Grado de Doctor.**

**Fdo.: Dra. Concepción Ruiz Rodríguez**

**Dra. OLGA GARCÍA MARTÍNEZ, Profesora Ayudante Doctor del Departamento de Enfermería de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Granada.**

**CERTIFICA:**

**Que ELVIRA DE LUNA BERTOS, Licenciada en Antropología Social y cultural, ha realizado bajo mi codirección el trabajo de Tesis Doctoral, sobre el tema: EFECTO DE LOS ANTIINFLAMARIOS SOBRE EL OSTEOLASTO: DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN, y cuenta con mi aprobación para ser presentada, a fin de obtener el Grado de Doctor.**

**Fdo.: Dra. Olga García Martínez**

**Dra. LOURDES DÍAZ RODRÍGUEZ, Profesora Ayudante del Departamento de Enfermería de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Granada.**

**CERTIFICA:**

**Que ELVIRA DE LUNA BERTOS, Licenciada en Antropología Social y cultural, ha realizado bajo mi codirección el trabajo de Tesis Doctoral, sobre el tema: EFECTO DE LOS ANTIINFLAMARIOS SOBRE EL OSTEOLASTO: DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN, y cuenta con mi aprobación para ser presentada, a fin de obtener el Grado de Doctor.**

**Fdo.: Dra. Lourdes Díaz Rodríguez**

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

***Artículos:***

De Luna-Bertos Elvira, Ramos-Torrecillas Javier, García-Martínez Olga, Díaz-Rodríguez L, Ruiz Concepción. Effect of aspirin on cell growth of human MG-63 osteosarcoma line. TheScientificWorldJournal 2012. Aceptado 22 Diciembre 2011 (In Press).

***Comunicaciones Nacionales e Internacionales:***

De Luna-Bertos E.

Título: Efecto de distintos antiinflamatorios no esteroideos sobre el osteoblasto: determinación del mecanismo de acción.

Tipo de participación: Comunicación Oral

Congreso: I Congreso Científico de Investigadores en formación.

Lugar de Celebración: Córdoba Fecha: 15/10/2009 hasta 16/10/2009

De Luna-Bertos E., Ramos-Torrecillas J., García-Martínez O., Díaz-Rodríguez L., Ruiz C.

Título: Efecto del Ketorolaco, Metamizol y Ácido Acetilsalicílico sobre el crecimiento celular de la línea celular MG63.

Tipo de participación: Comunicación Póster

Congreso: XXIX Congreso Internacional Sociedad Farmacéutica del Mediterráneo Latino.

Lugar de Celebración: Granada Fecha: 15/09/2010 hasta 18/09/2010

Mazzaglia G., De Luna-Bertos E., Ramos-Torrecillas J., Díaz-Rodríguez L., García-Martínez O., Ruiz C.

Título: Effect of Dexketoprofen on adhesion and growth of osteoblast-like cells

Tipo de participación: Comunicación Póster

Congreso: IADR

Lugar de Celebración: Budapest Fecha: 31/08/2011 hasta 03/09/2011

Reyes-Botella C., De Luna-Bertos E., Ramos-Torrecillas J., García-Martínez O., Díaz-Rodríguez L., Ruiz C.

Título: Valoración del efecto del Dexketoprofeno y Ketorolaco sobre la adhesión celular de la línea de osteosarcoma humano MG63.

Tipo de participación: Comunicación Póster.

Congreso: IX Congreso de la Sociedad Española de Cirugía Bucal.

Lugar de Celebración: Zaragoza Fecha: 29/09/2011 hasta 01/10/2011

De Luna-Bertos E., Ramos-Torrecillas J., García-Martínez O., Díaz-Rodríguez L., Ruiz C.

Título: Aspirin: Impact on bone cells behavior.

Tipo de participación: Comunicación Póster.

Congreso: World Congress on debates & consensus BMJD

Lugar de Celebración: Barcelona Fecha: 19/01/2012 hasta 22/01/2012

Ramos-Torrecillas J., De Luna-Bertos E., Díaz-Rodríguez L., García-Martínez O., Ruiz C.

Título: Study of the effect of different doses of Metamizol on human MG-63 osteosarcoma cell line.

Tipo de participación: Comunicación Póster.

Congreso: World Congress on debates & consensus BMJD



Lugar de Celebración: Barcelona

Fecha: 19/01/2012 hasta 22/01/2012

***Premios:***

De Luna-Bertos E., Ramos-Torrecillas J., García-Martínez O., Díaz-Rodríguez L., Ruiz C.

Título: Aspirin: Impact on bone cells behaviou.

Tipo de participación: Comunicación Póster.

Congreso: World Congress on debates & consensus BMJD

Lugar de Celebración: Barcelona

Fecha: 19/01/2012 hasta 22/01/2012



## INDICE:

I. ABSTRACT.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	9
1. Tejido óseo.	
1.1. Las células del tejido óseo.	
1.2. Matriz ósea.	
1.3. Organización macroscópica del hueso.	
1.4. Formación y crecimiento del tejido óseo.	
1.5. Modelado y remodelado del tejido óseo.	
1.6. Reparación ósea.	
2. Osteoblasto.	
2.1. Diferenciación.	
2.2. Identificación.	
2.3. Funciones del osteoblasto.	
3. Inflamación.	
3.1. Fases de la inflamación.	
3.2. Mediadores de la inflamación.	
4. Los Antiinflamatorios no esteroideos.	
4.1. Mecanismo de acción.	
4.2. La acción farmacológica.	
4.3. Reacciones adversas.	
4.4. Clasificación según grupo farmacológico.	
5. Osteoblastos y AINEs	
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	59
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	63
1. Línea celular de osteoblastos humanos.	
2. Cultivo de la línea celular MG63.	
3. Efecto de los AINEs sobre distintos parámetros de la línea MG63.	
3.1. Efecto de los AINEs sobre el crecimiento celular.	
3.1.1. Estudio de la proliferación celular.	
3.1.2. Estudio del ciclo celular.	
3.1.3. Efecto de los AINEs sobre la inducción de apoptosis.	
3.1.3.1. Determinación de la inducción de apoptosis por citometría de flujo.	
3.1.3.2. Determinación de la inducción de apoptosis por microscopía de fluorescencia.	

3.1.4.	Estudio de la citotoxicidad de los AINEs sobre la línea MG63.	
3.2.	Efecto de los AINEs sobre la diferenciación celular de línea MG63.	
3.2.1.	Estudio de la mineralización.	
3.2.2.	Estudio de la Síntesis de Fibras de Colágeno.	
3.2.3.	Estudio de la Actividad Fosfatasa Alcalina (AP).	
3.3.	Efecto de los AINEs sobre la adhesividad celular.	
3.4.	Efecto de los AINEs sobre el fenotipo.	
3.5.	Efecto de los AINEs sobre la capacidad fagocítica.	
V.	RESULTADOS.....	81
	Efecto de los AINEs sobre la línea celular MG63.	
1.	Efecto de los AINEs sobre el crecimiento celular.	
1.1.	Estudio de la proliferación celular.	
1.2.	Estudio del ciclo celular.	
1.3.	Efecto de los AINEs sobre la inducción de apoptosis.	
1.3.1.	Determinación de la inducción de apoptosis por citometría de flujo.	
1.3.2.	Determinación de la inducción de apoptosis por microscopia de fluorescencia.	
1.4.	Estudio de la citotoxicidad de los AINEs sobre la línea MG63.	
2.	Efecto de los AINEs sobre la diferenciación celular de línea MG63.	
2.1.	Estudio de la mineralización.	
2.2.	Estudio de la Síntesis de Fibras de Colágeno.	
2.3.	Estudio de la Actividad Fosfatasa Alcalina (AP).	
3.	Efecto de los AINEs sobre la adhesividad celular.	
4.	Efecto de los AINEs sobre el fenotipo.	
5.	Efecto de los AINEs sobre la capacidad fagocítica.	
VI.	DISCUSIÓN.....	123
1.	Efecto de los AINEs sobre el crecimiento celular.	
2.	Efecto de los AINEs sobre la diferenciación celular de línea MG63.	
3.	Efecto de los AINEs sobre la adhesividad celular.	
4.	Efecto de los AINEs sobre el fenotipo.	
5.	Efecto de los AINEs sobre la capacidad fagocítica.	
VII.	CONCLUSIONES.....	147
VIII.	BIBLIOGRAFÍA.....	151



## **ABSTRACT**

Bone is a highly complex tissue formed by organic matrix and specific bone cells. These cells are categorized in a presumed linear sequence progressing from osteoprogenitors to pre-osteoblasts, osteoblasts and osteocytes. Osteoblasts are functionally the most important cells, characterized by their localization in bone, ability to form mineralized matrix, and capacity to synthesize bone proteins. The proliferation and differentiation of osteoblastic cells are regulated by complex interactions among systemic hormones, cytokines and local growth factors.

Osteoblasts play a fundamental role in bone formation and repair. Also these cells have additional functions related to the immune system, including phagocytic activity, T-lymphocyte stimulation and cytokine synthesis. The specific antigenic profile of osteoblasts has been investigated *in vivo* in bone tissue sections and *in vitro* in primary cultures and human osteosarcoma cell line MG-63. This profile is modulated by the presence of different cytokines and growth factors. These data suggested that osteoblasts may be functionally related to certain dendritic cells and may play an additional role in bone tissue to the one they are classically assigned.

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are among the most widely prescribed drugs worldwide and have multiple therapeutic indications e.g., skeletal muscle diseases and cephalalgias. They are administered postoperatively to achieve analgesia and reduce inflammation, especially after surgery affecting bone tissue. The effect of NSAIDs on bone healing has been evaluated in several studies, which have shown that some NSAIDs have an adverse effect on bone tissue through regeneration delay.

The main pharmacological effect of NSAIDs is the suppression of cyclooxygenase (COX) activity, and thus suppresses prostaglandin (PG) synthesis. PGs, especially PGE<sub>1</sub> and PGE<sub>2</sub>, have been indicated to stimulate bone formation and resorption *in vivo* and *in*

*vitro*. The mechanism by which NSAIDs exert their action on cell growth is under debate. Some authors cite the capacity of NSAIDs to inhibit synthesis of PGs, but on the other hand, recent studies have reported that these drugs have a direct effect on the cell cycle and induction of apoptosis. *In vitro* findings show that therapeutic doses of Ketorolac, Indomethacin, or Diclofenac induce cell death in osteoblasts cultures from rat foetal calvaria and may suppress bone formation and impair bone remodelling by arresting cell cycle in phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>.

The objective of the present study was to analyze the short-term effect of four NSAIDs, Dexketoprofen, Ketorolac, Metamizole and Aspirin on different cell parameters of human osteoblasts-like cells (line MG63): growth, differentiation, antigenic expression, phagocytic activity and cell adhesion.

Human MG-63 osteosarcoma cell line was used in our study because it is widely used to investigate human osteoblasts because of their similar properties.

MTT spectrophotometry was used to determine cellular proliferation and cell adhesion. Flow cytometry was used to study antigenic profile, phagocytic activity, apoptosis and cell cycle. The osteoblastic differentiation was evaluated by mineralization (Alizarin red S staining), alkaline phosphatase activity (spectrophotometric analysis) and synthesis of collagen fibers (Sirius Red F3Ba).

In relation to cellular growth our data showed that the proliferative capacity of MG63 cells was inhibited after 24 hours of treatment in a dose-dependent manner. Thus, different doses of Dexketoprofen and Ketorolac evaluated (0.1, 1, 5, 10, 100 y 1000 µM) showed an inhibitory effect on proliferative capacity; however, the Metamizol exerted an adverse effect on growth of MG63 line from the dose 10 µM; while treatment with Aspirin, only showed adverse effect from the dose 20 µM. Moreover, cell cycle analysis



showed an increase the percentage of cells in phase  $G_0/G_1$  in cultures treated with Dexketoprofen and Ketorolac at 1 and 10  $\mu\text{M}$  doses. Moreover, we observed an increased number of apoptotic cells after treatment with Ketorolac and Dexketoprofen at doses of 1  $\mu\text{M}$  and 10  $\mu\text{M}$  respectively. These findings suggest that the adverse effects of these drugs on osteoblast growth could be depending on an arrest of cell cycle and/or induction of cells apoptotic.

In contrast, Metamizol treatment showed a slighter effect on osteoblast proliferation at therapeutic doses. Only after a dose 10  $\mu\text{M}$  showed a slight decrease in the number of viable cells over the control group. We detected a greater effect on the cellular proliferation at 100 and 1000  $\mu\text{M}$ . In relation with cell cycle, none of these doses showed a significant effect, however a slighter increased in the percentage of apoptotic cells were detected at 10  $\mu\text{M}$ . At this point, it could be speculated that the decrease of number of viable cells after 24 h may be due to the presence of this drug at doses 10, 100 and 1000  $\mu\text{M}$ .

Our result with Aspirin at therapeutic doses, allow us to rule out an adverse effect on bone. Above dose 10  $\mu\text{M}$  only we observed a decrease of osteoblast proliferative capacity over the control group. These data are closely related to the results obtained by analysing the effect of Aspirin on cell cycle and apoptotic induction.

An important data was the adverse effect shown in osteoblastic-cell growth by the treatment with all the NSAIDs at high doses (100 y 1000  $\mu\text{M}$ ).

Regarding our results, we observed that treatment of osteoblastic cells with Dexketoprofen, Ketorolac, Metamizol and Aspirin, at therapeutic doses, inhibited the differentiation. This is showed by inhibition of alkaline phosphatase synthesis after 24 h,

inhibition of mineralization process by decreasing of the number and size of calcium nodules obtained by MG63 cell-line cultured in osteogenic medium.

Cellular adhesion is an important process on bone repair and it is in relation to cell growth, cell migration and cell differentiation. Our results showed that Dexketoprofen, Ketorolac and Metamizol, especially at dose of 10  $\mu\text{M}$ , significantly increased the adhesiveness of MG63 line on plate surface in the early hours of treatment (1-2 h). However, Aspirin cultures treated with different doses of Aspirin (1, 10 y 20  $\mu\text{M}$ ) did not show any effect on the cells adhesion.

Osteoblasts express a number of surface antigens, which are related to the degree of differentiation and/or cellular activation and are as follow: CD54, CD80, CD86 and HLA-DR. Our data showed that treatment for 24 h with different NSAIDs increased the CD54 percentage of expression. This marker is expressed in high percentage in preosteoblasts and osteoblasts immature. After treatment, we did not observe any changes in the expression of the other markers studied. Thus, Dexketoprofen at 1  $\mu\text{M}$  reduced CD80 and CD86 expression; Ketorolac at 10  $\mu\text{M}$ , only decreased CD86 expression and Aspirin only modulated CD86 expression at dose of 20  $\mu\text{M}$ . Metamizol produced a modulation of the three markers CD80, CD86 and HLA-DR at two doses studied. In this sense, immature dendritic cells treated with aspirin enhanced CD54 expression and decreased costimulators molecules expression.

Osteoblasts have phagocytic activity against different target particles. Our results showed a decrease in phagocytic capacity of MG63 cell line, as a result of treatment with the four NSAIDs tested. This effect is attributed to inhibition of differentiation that was observed after treatment.

In conclusion, our results suggest that Dexketoprofen and Ketorolac at therapeutic doses reduce osteoblast growth by arresting cell cycle in phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, and apoptosis induction. Metamizol and Aspirin only have shown effect at 10 and 20 μM, respectively. The four NSAIDs studied inhibited the differentiation process. We think that this effect is in relation with antigenic expression modulation and phagocytic capacity.

## **INTRODUCCIÓN**

## **1. TEJIDO ÓSEO.**

El tejido óseo es el principal componente del esqueleto adulto y constituye uno de los sistemas mayores del organismo. Es un tejido dinámico, que consta de un componente celular y una matriz orgánica calcificada. Además de proporcionar protección a los órganos vitales y el apoyo estructural para los músculos, ligamentos y tendones, el hueso es el principal reservorio de iones esenciales, ofrece un lugar de apoyo para la hematopoyesis y regula el metabolismo (McGee-Lawrence y Westendorf, 2011, Ksiezopolska, 2010). El esqueleto humano se compone de 213 huesos propiamente formados; los cuales, presentan formas y tamaños diferentes, pero poseen una estructura común. Una corteza con una mayor densidad que constituye el hueso compacto o cortical cuya superficie interna se halla en continuidad con hueso menos denso y de aspecto esponjoso o hueso trabecular. Entre el hueso cortical, que viene a representar el 80% del total del hueso y el trabecular, que constituye el 20% restante, no existen límites perfectamente marcados, sólo pequeñas zonas de transición (Bostrom, 2000).

### **1.1. Las células del tejido óseo.**

El componente celular del tejido óseo lo forman tres poblaciones bien definidas:

- 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.

Todas estas células tienen un origen común y proceden de un “pool” de células madres mesenquimatosas indiferenciadas y pluricelulares, las cuales, se multiplican y

diferencian, en los tres tipos mencionados. Las células óseas están organizadas en unidades especiales llamadas *unidades óseas multicelulares* (Bone Multicellular Units; BMUs) (Eriksen, 2010; Papachroni y col., 2009; Kassen y col., 2008; Frost, 2001). La principal función de éstas BMUs es mediar en la remodelación ósea, manteniendo la integridad del esqueleto a través de repetitivos ciclos de resorción y formación de hueso (Eriksen, 2010; Kassen y col., 2008; Frost, 2001; Parfitt, 1991).

#### *Osteoblastos:*

Los osteoblastos son las células responsables de sintetizar y secretar la matriz ósea y se localizan en las superficies activas del hueso (Yonezawa y col., 2011; Manolagas, 2000; Ducey y Karsenty, 1998). Morfológicamente los osteoblastos tienen un cuerpo celular cúbico o prismático del que nacen prolongaciones citoplasmáticas más o menos alargadas. Poseen un núcleo redondeado situado en el extremo que se halla más alejado de la superficie ósea sobre la que se asientan, y con un nucleolo voluminoso. El citoplasma, rico en ribosomas libres y mitocondrias, presenta abundantes cisternas de retículo endoplasmático rugoso y un aparato de Golgi yuxtannuclear bien desarrollado (Lian y col., 1999). Estas características son típicas de aquellas células con capacidad para segregar grandes cantidades de proteínas (Puzas, 1996).

Cuando los osteoblastos terminan con la fase de formación de hueso, pueden quedarse en la superficie como células de revestimiento óseo, o bien, se rodean a sí mismas con la matriz convirtiéndose en osteocitos (Eriksen, 2010). La principal función de los osteoblastos, como células de revestimiento, es formar y secretar las enzimas que eliminan la capa de osteoide que cubre a la matriz mineralizada. De esta forma los osteoclastos pueden adherirse al hueso e iniciar la resorción (Buckwalter y Cooper, 1987).

*Osteocitos:*

Los osteocitos derivados por diferenciación de los osteoblastos, forman parte del tejido óseo adulto y constituyen más del 90% de las células del hueso humano maduro (Eriksen, 2010). Los osteocitos están encargados de mantener la integridad estructural de la matriz mineralizada. Intervienen además, en la liberación o depósito de calcio para el mantenimiento de la homeostasis del calcio en el cuerpo y expresan moléculas específicas que controlan la formación de hueso y el metabolismo del fosfato, tales como, la proteína de matriz dentinaria 1 (DMP-1), el factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF-23) y la esclerostina (Eriksen, 2010; Bonewald, 2006).

Morfológicamente, el cuerpo celular de los osteocitos caracterizado por ser fusiforme o estrellado, da nacimiento a numerosas y finas prolongaciones tubulares más o menos alargadas, conectadas entre sí y con células de la superficie (osteoblastos). Estas conexiones permiten sentir a las células cómo se deforma el hueso debido a las fuerzas mecánicas, y coordinar el proceso de remodelado (Lian y col., 1999; Boivin y col., 1990). Su muerte por microfisuras se ha sugerido como el evento principal en el inicio de la resorción osteoclástica del hueso (Eriksen, 2010; Cardoso y col., 2009). Su citoplasma contiene los mismos orgánulos que los osteoblastos pero en menor cantidad, al tener una capacidad metabólica escasa, aunque su presencia parece necesaria para mantener las propiedades biomecánicas del tejido óseo. La cavidad de la matriz ósea que contiene el cuerpo celular del osteocito se denomina laguna osteocitaria y los diminutos canalículos que albergan sus prolongaciones citoplasmáticas reciben el nombre de conductos calcóforos. El estudio de la ultraestructura del osteocitos muestra que esta población celular posee un aparato de Golgi y un retículo endoplasmático rugoso menos desarrollado

que los osteoblastos. Estas organelas se concentran en el cuerpo celular donde se disponen alrededor de un núcleo ovalado.

La situación de los osteocitos es teóricamente ideal para detectar el estrés mecánico y las microlesiones de la matriz. Estas células podrían transmitir señales a las células de revestimiento que utilizarían la información recibida para modular localmente el remodelado (Aubin y col., 1995 y 1993).

#### *Osteoclastos:*

Los osteoclastos son células óseas muy voluminosas, de forma generalmente redondeada. Se caracterizan morfológicamente por tener la particularidad de poseer varios núcleos, y por presentar en su citoplasma abundantes organelas, mitocondrias, lisosomas, vesículas y numerosas microvellosidades. Los osteoclastos proceden de las células madres hematopoyéticas extraesqueléticas, y se encuentran en la superficie del hueso que va a sufrir la resorción. Para poder reabsorber la matriz, los osteoclastos se unen a la superficie ósea acidificando el medio al secretar enzimas y protones, rompiéndole así, los enlaces entre los cristales de hidroxapatita y el colágeno (Khan y col., 2001; Peck y Woods, 1998).

## **1.2. Matriz Ósea.**

Las células del tejido óseo están ubicadas en la matriz ósea, estructura formada por una matriz orgánica impregnada de sales minerales.

La matriz orgánica está formada por colágeno tipo I, que representa el 90%, y el 10% restante lo compone un largo número de proteínas no colagénicas, las cuales,



participan en el proceso de maduración de la matriz, la mineralización y, aunque sus funciones no son del todo conocidas, parece que regula la actividad funcional de las células óseas (Kassem, 2008).

Las sales minerales son el componente inorgánico del hueso, que está compuesto por depósitos de fosfato cálcico cristalino y una pequeña cantidad de fosfato cálcico amorfo. Junto al fosfato cálcico, el tejido óseo contiene numerosos iones que parecen estar adsorbidos sobre la superficie de los cristales de hidroxiapatita; entre ellos están: el magnesio, potasio, sodio, carbonato, citrato, y algunos menos comunes como el plomo, el oro y otros minerales pesados (Geneser, 2000).

La matriz del tejido óseo está recorrida por un sistema de cavidades fusiformes que contienen a los osteocitos y sus prolongaciones. Estas cavidades denominadas osteoplastos, se comunican entre sí mediante canalículos. De cada uno de estos osteoplastos, que contiene el cuerpo celular de un osteocito, parten los canalículos, que son unos túneles finos y numerosos, que se comunican unos con otros formando una pared canalicular anastomótica; que contiene las prolongaciones citoplasmáticas (no anastomosadas) de los osteocitos. Entre la membrana citoplasmática de los osteocitos y de sus prolongaciones, por una parte, y la pared de los osteoplastos y de los canalículos, por otra, existe una débil cantidad de líquido intersticial (Eriksen, 2010).

### **1.3. Organización macroscópica del hueso.**

Existen dos tipos de organización del tejido óseo en los huesos:

- Tejido esponjoso (hueso trabecular): formado por una serie de trabéculas o láminas intersticiales colocadas de forma irregular, que al entrecruzarse dejan unos espacios

huecos intercomunicados donde se aloja la médula ósea (Cui, 2011; Eriksen, 2010; Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil y col. 2006). Predomina en el esqueleto axial y es adecuado para resistir las fuerzas de compresión y tensión que se generan en esta región (Stevens y Lowe, 2007).

- Tejido compacto (hueso cortical): masa compacta sin espacios huecos visibles. Existe una red de finos canales longitudinales (conductos de Havers) y transversales (conductos de Volkmann) que alberga los nervios y los vasos, estos últimos posibilitan su nutrición. El hueso compacto predomina en el esqueleto apendicular y es adecuado para resistir la flexión, la torsión y el cizallamiento (Cui 2011; Fernández-Tresguerres- Hernández-Gil y col., 2006).

Todos los huesos están recubiertos por una capa vascularizada de tejido conectivo, íntimamente adherida al hueso, donde se insertan músculos, tendones y ligamentos, denominada periostio (Stevens y Lowe, 2007).

Los extremos largos de los huesos se denominan epífisis. El tallo o parte media es conocido como diáfisis y la parte cartilaginosa entre la diáfisis y la epífisis se llama metáfisis, que permite el crecimiento de los huesos en la edad joven (Stevens y Lowe, 2007).

#### **1.4. Formación y crecimiento del tejido óseo.**

En la formación del hueso pueden distinguirse cuatro etapas, independientemente del tipo de tejido óseo obtenido y el lugar de formación:

- Diferenciación de los osteoblastos a partir de las células-madre.

- Secreción por los osteoblastos de la matriz orgánica.
- Mineralización de la matriz orgánica.
- La aparición de los osteoclastos.

La *osificación* es la aparición de tejido óseo en un tejido no óseo al que sustituye progresivamente. Según la naturaleza de este tejido no óseo, se distinguen dos tipos de osificación:

- Endoconjuntiva (directa): Las células mesenquimatosas indiferenciadas se transforman en osteoblastos en el seno del tejido conjuntivo y se lleva a cabo la osteogénesis. Cuando se ha constituido una pequeña zona de tejido óseo, otras células mesenquimatosas se diferencian en osteoblastos, que se disponen alrededor de la zona ósea formando una hilera de osteoide, que es la denominación que tiene la matriz ósea cuando no está calcificada. (Cui, 2011; Poirier, 2002).
- Endocondral (indirecta): tiene lugar en el tejido cartilaginoso, el cual, es reemplazado por tejido óseo seguido de un crecimiento longitudinal del hueso. Es el mecanismo por el cual, la mayoría de los huesos de los vertebrados se desarrollan (Carl y col., 2004; Kronenberg, 2003; Poirier, 2002).

### **1.5. Modelado y Remodelado del tejido óseo.**

El tejido óseo al igual que el resto de tejido del organismo, sufre un proceso de crecimiento y desarrollo desde el comienzo de la vida a la edad adulta. Este es un proceso dinámico, en el que están implicados el proceso de modelado, responsable del control del crecimiento y morfología del hueso y el proceso de remodelado, responsable del equilibrio

entre la formación y la resorción. De tal modo que, aunque macroscópicamente el esqueleto parece ser un órgano estático, el tejido óseo es bastante activo a nivel microscópico. Cada hueso está diseñado para poder soportar niveles máximos de tensión mecánica con la menor masa de hueso posible. Debido a esto, es por lo que los huesos presentan una fase dinámica de crecimiento y una fase de resorción. (Ksiezopolska-Orlowska, 2010; Papachroni y col., 2009).

Por tanto, el modelado y remodelado, son los procesos que dan lugar a los cambios en la geometría y la masa del hueso (Einhorn, 1996).

*El modelado* es el proceso organizado de la célula ósea que permite el crecimiento óseo y regula la resistencia del hueso, mediante la actividad de los osteoblastos y los osteoclastos situados estratégicamente. Se realiza por medio del crecimiento óseo endocronal y constituye la base del crecimiento longitudinal del hueso. Es una etapa de crecimiento que se prolonga hasta la adolescencia (Frost, 1990).

*La remodelación ósea* (formación y resorción) es un proceso continuo y secuencial de degradación y reparación de las cavidades microscópicas del hueso. En el adulto, cerca de un 8% del tejido óseo es renovado anualmente, esta cifra es superior en el joven e inferior en el anciano. Está basado en la resorción y formación de poblaciones celulares en relación con el reemplazamiento de hueso viejo por joven, con el fin de asegurar la integridad del esqueleto (Eriksen, 2010; Gallager, 2008).

Esta renovación permanente del tejido óseo adulto trae consigo dos consecuencias importantes:

- permite al tejido óseo desempeñar su función metabólica (liberación de minerales en el momento de su destrucción);

- permite una continua adaptación del hueso a las nuevas condiciones mecánicas para la reorganización de su arquitectura interna.

La remodelación ósea se lleva a cabo por un grupo de células que constituyen la BMU, que comprende los osteoclastos, osteoblastos y osteocitos. Está sometida a un estricto control, estableciéndose un equilibrio entre la formación ósea y la resorción (Papachroni y col., 2009; Roodman, 1996). En este proceso, los osteoclastos son las células encargadas de la resorción ósea y los osteoblastos, ocupando los espacios vacíos dejados por los osteoclastos, de la formación ósea, lo que constituye la unidad remodeladora del hueso (URH) (Yonezawa, 2011; Seeman, 2002; Frost, 1991). Este proceso de remodelación se puede dividir en varias etapas: el cese de la actividad osteoclástica y la desaparición de los osteoclastos del lugar de resorción, la atracción de los precursores de osteoblastos a dicho lugar; la proliferación de los precursores de osteoblastos; la diferenciación de estos precursores a osteoblastos maduros con capacidad de secretar colágeno y formación de matriz mineralizada y el cese de la actividad osteoblástica (Ksiezopolska-Orlowska, 2010; Pfeilschifter y Mundy, 1987). Se cree que la carga mecánica juega un papel regulador sobre el proceso de la remodelación ejerciendo una retroalimentación entre la formación del hueso y la resorción. Los osteoclastos son activados en respuesta de una bajada de la carga, mientras que los osteoblastos son estimulados por un incremento de la carga positiva (Ksiezopolska-Orlowska, 2010; Brandi, 2009; Smith y col., 2002).

La resorción ósea es mucho más rápida que la formación: un área de hueso puede estar resorbida en 2-3 semanas pero el hueso tarda como mínimo tres meses en la reconstrucción de dicha área (Harada y Rodan, 2003).

La remodelación de hueso comienza con la osteólisis a cargo de los osteoclastos, que liberan los minerales y degradan la sustancia osteoide cuya profundidad varía entre las 60µm de las personas jóvenes y las 40µm de las personas mayores; este período de resorción tiene una duración media de 30 a 40 días (Eriksen, 2010). Las lagunas resultantes son reparadas por osteogénesis (formación de hueso), 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, son atrapados en el frente de calcificación, incluyéndose en el hueso como osteocitos, los cuales tienen a su cargo la nutrición del hueso y pueden desarrollar actividad desmineralizante. La duración de esta fase del ciclo en el hueso cortical es más corta que en el esponjo. De tal modo que, en el hueso cortical la media de tiempo es de 120 días, mientras que la superficie total de hueso esponjoso está completamente remodelada tras un periodo de dos años (Agerbaek y col., 1991). La osteólisis y la osteogénesis están acopladas, pero el remodelamiento no es perfecto, ya que, al final de cada ciclo queda un pequeño déficit de masa ósea, lo que explica que a partir de la tercera y cuarta década aparezca una pérdida paulatina de hueso (Robling y col., 2006; Ducky y col., 2000). En estados de enfermedad como la osteoporosis, el defecto principal es que los osteoblastos no pueden volver a llenar el vacío de resorción que conduce a una pérdida neta de hueso en cada evento de remodelación (Ksiezopolska-Orlowska, 2010; Eriksen, 1990).

Además, los osteoblastos se ven sometidos a procesos de muerte celular o apoptosis en los lugares de remodelación, observándose numerosos signos en los lugares de resorción como consecuencia de la actividad osteoclástica, con aumento de los niveles de calcio (Zaidi, 1990) y de fosfato (Yates y col., 1991).

## **1.6. Reparación ósea.**

La reparación ósea es el proceso que tiene lugar después de un trauma óseo y generalmente ocurre en dos fases: una fase de reparación inicial y una segunda fase de remodelación. Es un proceso complejo que requiere de la interacción de las células mesenquimales en las diferentes etapas de diferenciación y de una cascada coordinada de factores de crecimiento, citoquinas y proteínas osteoinductoras (Coulibaly y col., 2010, Papachroni y col., 2009; Mott y col., 2002).

En primer lugar, en la zona afectada por un trauma, se produce un hematoma que es reabsorbido por los macrófagos. Paralelamente, y como consecuencia del proceso inflamatorio, 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 (Boursino, 2009). Dependiendo del estímulo, las células emigran, proliferan y se diferencian en células endoteliales, fibroblastos, condroblastos y osteoblastos, los cuales, producirán los 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 (LaStayo y col., 2003). Esta fase se conoce como fase de inflamación (Van Gaalen, 2008).

La fase de reparación inicial aparece a continuación de la fase de inflamación. En ella, son las células formadoras de hueso las que intervienen. Estas células establecen puentes de tejido óseo inmaduro, sin orientación espacial definida (callo de fractura), que unen entre sí los extremos del hueso fracturado.

En una fase posterior se lleva a cabo la remodelación. El tejido óseo inmaduro formado en la fase inicial es sustituido por otro tejido de tipo laminar, orientado según las líneas de fuerza que actúan sobre la zona (Van Gaalen, 2008; LaStayo y col., 2003).

En el hueso también es común que se produzcan microfracturas trabeculares, las cuales no modifican la morfología externa del hueso y suelen ser causadas por la fatiga mecánica. Estas fracturas microscópicas son igualmente reparadas a través de la formación de microcallos de fractura, los cuales se forman mediante una dinámica similar a la seguida en la formación de los grandes callos (LaStayo y col., 2003).

## **2. OSTEOLASTO.**

El osteoblasto es la célula del hueso responsable de la formación del tejido óseo. Se origina a partir de células mesenquimales primitivas, que dan lugar a una progenie con capacidad de diferenciación limitada.

Los mediadores que inducen el proceso de diferenciación no se conocen bien, aunque está demostrado que los glucocorticoides, factores hormonales, factores de crecimiento y ciertas citoquinas desempeñan una función reguladora en estadios de diferenciación temprana en algunas líneas celulares (Papachroni y col., 2009; Robling, 2006; Mott, 2002).



## 2.1. Diferenciación.

La diferenciación de cualquier población celular es el término reservado para la especialización de la estructura y de la función celular. Tienen carácter progresivo y al parecer irreversible (Becker y col., 2009).

Según las etapas de proliferación celular, la secuencia del desarrollo osteoblástico comprende tres fases: proliferación, síntesis de matriz ósea o maduración y mineralización (Liu y col., 1994; Malaval y col., 1994).

Las células osteoblásticas se dividen en una sucesión lineal desde osteoprogenitoras a preosteoblastos, osteoblastos y osteocitos.

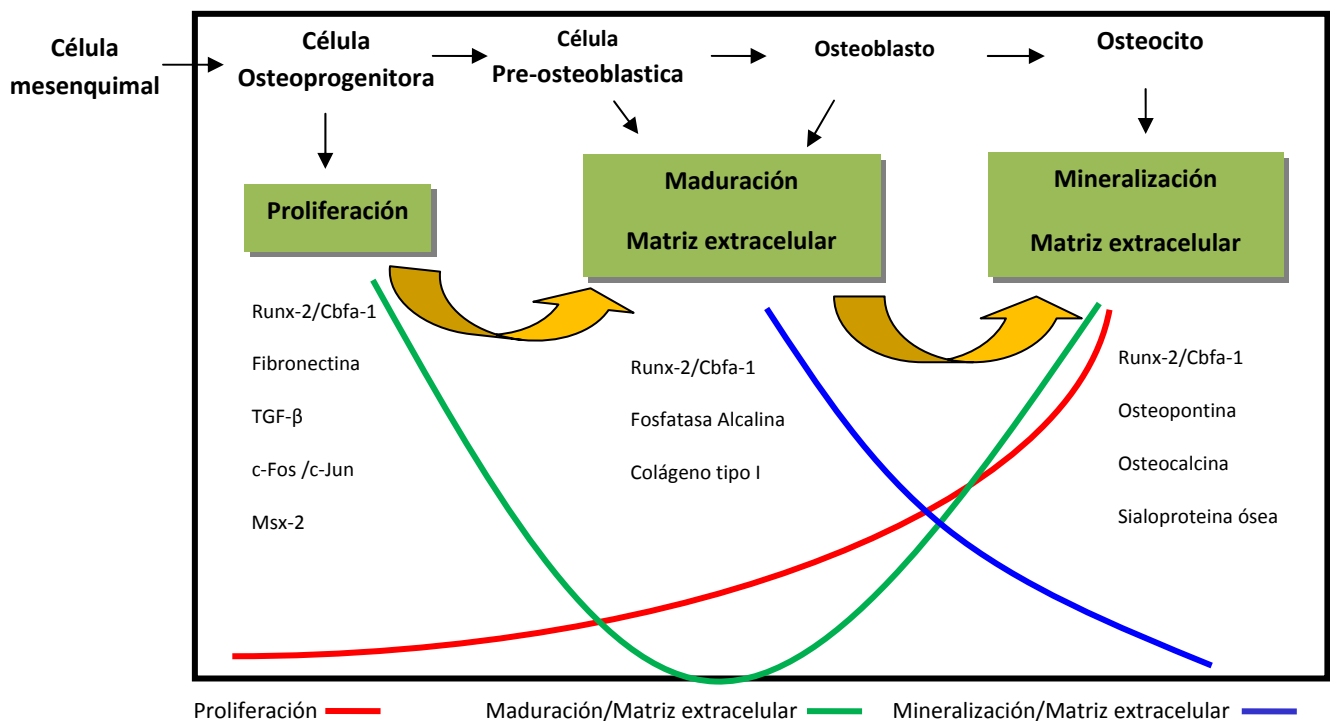


Figura 1. División del linaje osteoblástico.

Las células osteoprogenitoras, también conocidas como células madre, son células indiferenciadas con morfología fibroblástica. Durante la formación del hueso estas células sufren una división y diferenciación a células formadoras de hueso. En reposo, son capaces de transformarse en osteoblastos y secretar matriz ósea. Se encuentran en las superficies externas e internas de los huesos (células periósticas y células endósticas). Son capaces de dividirse y proliferar, y se diferencian en tres tipos de células, además de los osteoblastos: adipocitos (Gimble y col., 1996), condroblastos y fibroblastos (Hall y col., 2001).

Los preosteoblastos son células de aspecto fibroblástico que se encuentran cercanas a la superficie ósea, pero separadas de ésta, por otros tipos celulares como las células del endostio (Puzas, 1996). Derivan de una célula madre del estroma medular, y en ellas recae el potencial proliferativo del linaje osteoblástico.

Los osteoblastos son células fusiformes con citoplasma basófilo y ricas en unas isoenzimas específicas de la fosfatasa alcalina (AP) (Puzas, 1996). Suelen considerarse células con diferenciación terminal, por tanto incapaces de dividirse. No obstante, existen datos que sugieren que conservan, al menos en parte, la capacidad proliferativa.

Los osteoblastos totalmente maduros, se hallan en contacto directo con la superficie ósea formando grupos compactos de una sola capa de espesor, que se caracterizan por tener la capacidad de sintetizar la matriz mineralizada, controlando el depósito de sales minerales. Además, son los responsables de la formación del componente orgánico de la matriz ósea, la síntesis de colágeno tipo I (COLL-I), osteonectina, osteopontina, osteocalcina, AP, factores de crecimiento, el ligando de receptor activador para el factor nuclear kB (RANKL), el cual, es necesario para la diferenciación de los osteoclastos, así como el receptor para la hormona paratiroidea (PTH) (Eriksen, 2010; Kassen y col., 2008;

Bonewald, 2006; Murshed y col., 2005). Los cambios en la expresión de estas moléculas, están relacionados con los distintos grados de desarrollo y maduración de los osteoblastos.

Los osteoblastos pasan por tres estados funcionales, tanto *in vivo* como *in vitro* (Lian y Stein, 1992; Lian y Stayn, 1993): *proliferación* celular y síntesis de los componentes orgánicos de la matriz ósea; *maduración* de la matriz ósea (cambios en la composición y organización de la matriz que la hacen competente para ser mineralizada), y *depósito de mineral*.

Los osteoblastos pueden alojarse en la superficie ósea o quedar rodeados por la matriz que sintetizan. Cuando permanecen en la superficie, finalizan la síntesis de la matriz, se aplanan y pasan a ser células de revestimiento, conocidas como “lining cell” o células del endostio. Estas células a través de la producción de factores locales como la Interleuquina-6 (IL-6) o la Interleuquina-11 (IL-11) parecen desarrollar un control sobre el remodelado óseo (Manolagas y col., 1995). Los osteoblastos que quedan en el espesor de la matriz se diferencian, adquiriendo una apariencia estrellada, denominándose osteocitos (Lian y Stein, 1992).

Por tanto, una vez que el osteoblasto ha desempeñado su función, como célula formadora de hueso, y no se requiere más síntesis de matriz ósea, los osteoblastos se inactivan perdiendo su capacidad sintética, quedando como células de revestimiento que cubren todas las superficies de los huesos o bien son atrapados en el frente de calcificación, incluyéndose en el hueso como osteocitos (Eriksen, 2010).

## **2.2. Identificación.**

Clásicamente, la identificación del osteoblasto se ha venido realizado por su ubicación en el hueso, si bien, actualmente se realiza en base a cuatro parámetros: morfológicos, bioquímicos, genéticos y antigénicos.

### a) Identificación morfológica

Los osteoblastos son células grandes con forma cúbica o prismática, el núcleo es redondeado y tienen un único nucleolo muy desarrollado, situado con frecuencia en el extremo de la célula y lo más distante de la superficie ósea. El citoplasma es rico en ribosomas y mitocondrias, lo que sugiere que estas células poseen un metabolismo muy activo. Dado que estas células son las responsables de la formación del tejido óseo, se ubican en el frente de avance del hueso que crece o se desarrolla; disponiéndose en una capa epitelioide de células cuboideas conectadas con otras, a través de expansiones finas y cortas.

El estudio ultraestructural, muestra que entre el núcleo y la membrana celular, se sitúan de manera sucesiva el aparato de Golgi y abundantes cisternas del retículo endoplasmático rugoso (Puzas, 1996). Hay numerosas vacuolas que contienen material amorfo o grumos de apreciable densidad. Estas características son típicas de células con capacidad para segregar grandes cantidades de proteínas. En ocasiones, se observan gotitas lipídicas y cuerpos densos limitados por membranas que se identifican como lisosomas (Tullberg-Reinert y Jundt, 1999).

### b) Identificación Bioquímica

Desde un punto de vista bioquímico los osteoblastos se caracterizan por la secreción de distintas proteínas como osteopontina, osteocalcina, colágeno tipo I y AP.

*Síntesis de osteopontina:* Es una glicoproteína hidrofílica y fosforilada, que posee aproximadamente 314 aminoácidos. El 20% de su peso molecular corresponde al ácido siálico. Es producida por una gran variedad de tipos celulares entre ellos el osteoblasto, estimulados por la 1- $\alpha$ -1,25-dihidroxitamina D. Dicha molécula se une a la hidroxiapatita y a las células, participando en la resorción ósea, mediante la fijación de los osteoclastos a la superficie de la fase mineral (Reinholt y col., 1990). Está expresada en zonas de inflamación y se liga a una gran variedad de receptores de superficie celular (integrinas y CD44).

La osteopontina tiene funciones proinflamatorias: presenta función quimiotáctica, inducción de la proliferación de células B y por lo tanto producción de anticuerpos, y aumenta la supervivencia celular de células inflamatorias; así como, funciones reparadoras: está implicada en la reparación de tejidos y tiene una actividad antiinflamatoria, inhibiendo la producción del óxido nítrico.

*Síntesis de osteocalcina:* Es una proteína morfogenética sintetizada por los osteoblastos que solo se encuentra en el hueso y representa entre un 10 y un 20% de las proteínas no colagénicas totales de la matriz extracelular (Coulibaly y col., 2010).

La síntesis de osteocalcina constituye un índice específico de la fase media de la diferenciación de los osteoblastos y desempeña un papel en el proceso de mineralización, en la calcificación ósea y en la inhibición del cartílago (Yang y col., 2001).

*Síntesis de AP:* se trata de un enzima hidrolítica o hidrolasa responsable de eliminar grupos de fosfatos de varios tipos de moléculas. Es un marcador elevado en todos los tejidos mineralizantes. El hueso es una de las principales fuentes de AP, que es una ectoenzima de los osteoblastos capaz de generar fosfato inorgánico extracelular. Se encuentra en el plasma de la membrana de los osteoblastos (Coulibaly y col., 2010). Es un indicador de la

actividad osteoblástica y osteolítica, cuya expresión, en los osteoblastos, guarda relación con el grado de maduración celular (Ducy y col., 2000).

La realización de técnicas citoquímicas para la localización de la AP se usa para la localización de poblaciones osteoblásticas en el hueso en desarrollo, así como, los preosteoblastos del tejido conectivo mesenquimal y del estroma medular (Dodds y col., 1994).

*Síntesis y secreción de colágeno:* el Colágeno tipo I, es sintetizado por los osteoblastos durante los últimos periodos de proliferación y los primeros periodos de la maduración de la matriz (Lian y Satyn, 1993; Stein y col., 1996). Es una molécula triple helicoidal compuesta por dos cadenas  $\alpha$ -1 polipéptidas y una cadena  $\alpha$ -2 (Coulibaly y col., 2011). Esta proteína es el mayor componente proteico del hueso, constituye el 90% de la matriz orgánica y se encuentra distribuida en concentraciones elevadas en hueso, piel, tendones y a nivel de los ligamentos, esclerótica, dentina, aponeurosis y cápsulas.

c) Identificación Antigénica:

Los osteoblastos poseen un perfil antigénico propio, en el que se combinan diferentes antígenos que son coexpresados por otras células que tienen su origen en la médula ósea.

Entre los antígenos típicamente expresados en células hematopoyéticas y que han sido descritos en osteoblastos humanos en cultivo cabe señalar la expresión del CD34, antígeno asociado con un origen hematopoyético. Si bien, la expresión de este marcador varía según la línea celular y el anticuerpo monoclonal (Abmo) utilizado, detectándose solo con un Abmo que es un "pool" frente a distintos epítomos de CD34, no detectándose el CD45, antígeno propio del linaje leucocítico. En relación a los antígenos de células B, los

osteoblastos son positivos para los antígenos CD20 y CD23, y negativos para el CD19. Los marcadores de la línea celular mielomonocítica detectada en el osteoblasto son el CD11b, CD13 y CD16; sin embargo, no expresan los antígenos CD14, CD15, CD33 y CD68. Los osteoblastos también muestran expresión positiva para los antígenos propios de células presentadoras de antígenos como CD44, CD54, CD80, CD86 y HLA-DR, para el marcador de células Natural Killer (NK), el CD56 y para una serie de antígenos cuya expresión no es específica de una determinada población celular como es CD10, CD25, CD38 y CD69. Finalmente, señalaremos expresión positiva del antígeno específico de las células foliculares dendríticas (FCD y DRC-1) (Reyes-Botella y col., 2002, 2000 y 1999).

Cabe señalar que los marcadores anteriormente indicados, no siempre se expresan en el 100% de la población analizada. Así, mientras que los antígenos CD10, CD13, CD44 y el antígeno específico de células dendríticas se expresan en el 100% de los osteoblastos humanos y no sufren cambio en su expresión como consecuencia del tratamiento con distintas citoquinas y/o factores de crecimiento, los antígenos CD54, CD80, CD86 y HLA-DR son antígenos que se expresan en parte de la población, y su expresión se ve modulada en respuesta a distintos tratamientos (Díaz-Rodríguez y col., 2012; Pérez y col., 2006; Reyes-Botella y col., 2002).

Los antígenos de membrana CD10, CD13, CD44, CD54, CD80, CD86, HLA-DR se han descrito tanto en osteoblastos humanos en cultivos primarios aislados a partir de muestras de tejido óseo (Reyes-Botella y col., 2002), en osteoblastos presentes en cortes de hueso humano (García-Martínez y col., 2006), como en osteoblastos transformados, es el caso de la línea celular de osteosarcoma humano, MG63 (Díaz-Rodríguez y col., 2009). Este hecho, junto a la modulación del perfil antigénico, bien de los osteoblastos humanos en cultivo o bien de la línea celular MG63, observada como consecuencia de distintos

tratamientos, es lo que ha llevado a algunos autores a sugerir que en el osteoblasto hay unos antígenos constitutivos y otros antígenos modulables (Díaz-Rodríguez y col., 2012; Díaz-Rodríguez y col., 2010; Pérez y col., 2006).

d) Identificación genética:

Los genes expresados en los fibroblastos y condrocitos, los podemos encontrar igualmente expresados en los osteoblastos, pero además, éstos tienen dos genes transcriptores específicos que son: la osteocalcina, inhibidor de la función osteoblástica que es expresada solamente por los osteoblastos que están completamente diferenciados y el factor de transcripción Cbfa1 (Karsenty, 2000; Ducy y col., 2000).

El Cbfa1 tiene un papel dominante en la diferenciación osteoblástica, y debido a esto, se puede deducir que también puede desempeñar un papel importante en la regeneración del hueso e inducir un ambiente (regenerador) embrionario en los tejidos finos dañados del adulto; por tanto, el Cbfa1 tiene todas las propiedades como factor de diferenciación para el linaje osteoblástico. Durante el desarrollo embrionario, el Cbfa1 es expresado justo antes de la diferenciación de los osteoblastos y sólo en células mesenquimales comprometidas para convertirse o en osteoblastos o en condrocitos (Ducy y col., 1997). Es el marcador más temprano y más específico de la osteogénesis (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil y col., 2006). Actúa como activador de la transcripción pudiendo inducir la expresión del gen específico de osteoblastos en fibroblastos, incluso en mioblastos. La expresión del Cbfa1 es regulada por distintos factores, como las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) (Ducy y col., 1997), o el propio gen (Ducy y col., 1999).



### **2.3. Funciones del osteoblasto.**

La función principal del osteoblasto a nivel del hueso es sintetizar los componentes de la matriz ósea y controlar la actividad de resorción de los osteoclastos. No obstante, junto a esta función clásica del osteoblasto actualmente se le atribuyen otras funciones asociadas al sistema inmune, como la síntesis de citoquinas, la estimulación y/o presentación de antígenos a los linfocitos T y la capacidad fagocítica frente a distintas dianas en cuanto a naturaleza y tamaño de éstas (Stanley, 2006; Rifas y col. 2003; Ruiz y col., 2003).

Varios estudios han demostrado que los osteoblastos secretan citoquinas, tales como las citoquinas proinflamatorias, entre las que se encuentran: Interleukina-1 (IL-1), Interleukina-6 (IL-6), Factor de Necrosis Tumoral (TNF- $\alpha$ ), Interleukina-12 (IL-12), Interleukina-18 (IL-18), Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Mastocitos (GM-CS/FM), quimioquinas como la Proteína Quimiotáctica de Monocitos tipo 1 (MCP-1), la Proteína Inflamatoria de Macrófagos (MIP) y la IL-8 (Matsuo e Irie, 2008; Schindeler y col., 2008; Bost y col., 2001; Bost y col., 2000; Udagawa y col., 1997). Igualmente se ha descrito la secreción por parte del osteoblasto de distintos factores de crecimiento como el TGF $\beta$ 1, el cual, puede también actuar como un factor inflamatorio (Reyes-Botella y col., 2002b; Robey y col., 1987). El osteoblasto, incluso, posee una expresión positiva a nivel intracitoplasmático para una serie de citoquinas que generalmente son expresadas y/o sintetizadas por células presentadoras de antígeno tales como IL-4, IL-12, IL-15, IL-18 o Interferón ganma (IFN $\gamma$ ), expresión que se ve modulada por el tratamiento con distintos factores de crecimiento (FGF, TGF $\beta$ 1 o PDGF), o bien por distintas citoquinas (IL-1 o IFN $\gamma$ ) (Ruiz y col., 2007).

Junto a la síntesis y secreción de citoquinas se sabe que esta población celular expresa receptores para distintas citoquinas, los cuales, mediatizan la respuesta para secretar productos de linfocitos activados (Rifas y col., 2003; Takeuchi y col., 1995; Ishibashi col., 1995).

Los osteoblastos, como se ha descrito anteriormente, expresan antígenos propios de células inmunocompetentes, y más concretamente de células presentadoras de antígeno, entre las que se incluyen moléculas co-estimuladoras y ligandos para dirigir las moléculas de la superficie de las células T, aspecto éste documentado, tanto en líneas de osteoblastos humanos, como en tejidos óseos intactos (Lisignoli y col., 2004; Reyes-Botella y col., 2002; Okada y col., 2002; Kikuchi y col., 2001; Nelissen y col., 2000; Reyes-Botella y col., 2000). La presencia de estos marcadores en la superficie celular del osteoblasto tiene una clara implicación funcional, como lo demuestra la capacidad del osteoblasto para estimular alogénicamente a los linfocitos T, lo que impulsó a autores como Ruiz y col. (2003) sugerir que los osteoblastos poseen capacidad presentadora de antígeno. En esta misma línea, Stanley y col., (2006), muestran que los osteoblastos humanos tienen propiedades inmunocompetentes e interaccionan bidireccionalmente con los linfocitos T, sugiriendo que estas interacciones observadas en estudios *in vitro* pueden extrapolarse a nivel fisiológico y sobre todo en situaciones patológicas que tienen lugar *in vivo*.

En relación con la capacidad fagocítica atribuida al osteoblasto, estudios realizados *in vitro*, tanto con células de origen humano, como con células de rata, han puesto de manifiesto dicha capacidad, al demostrar la incorporación en el citoplasma celular de distintas partículas diana después de un periodo de incubación conjunta. Las partículas diana estudiadas, son polímeros sintéticos y partículas de desecho de material protésico de diferente composición. En cuanto al tamaño de la partícula fagocitada, en general, eran de

pequeño tamaño con un diámetro comprendido entre 1 y 3  $\mu\text{m}$  (Heineman y col., 2000; Lohman y col., 2000; Pioletti y col., 1999). Posteriores estudios mostraron que esta capacidad fagocítica se extiende tanto a material sintético no degradable (bolitas de látex), como a distintos microorganismos (*Candida Albicans*, *Escherichia Coli* y *Klebsiella*) (Ruiz y col., 2003).

Las partículas fagocitadas ya sean restos de desecho de material protésico como material biológico, se incorporan al citoplasma celular. Cuando el material fagocitado son restos de material protésico, después de periodos prolongados de incubación, a nivel celular se observan signos de apoptosis o de necrosis celular (Lohman y col., 2000; Pioletti y col., 1999). Sin embargo, cuando las dianas fueron microorganismos, no se describen signos de deterioro celular, aunque sí se observan cambios a nivel de la membrana citoplasmática, la cual, mostraron una superficie irregular con abundantes extensiones citoplasmáticas y también se detecta un aumento del número de lisosomas y de inclusiones granulares (Ruiz y col., 2003). Heineman y col., (2000) muestran que los osteoblastos al ser incubados durante un largo periodo de tiempo con partículas diana poseen capacidad fagocítica y expresan el antígeno CD68, marcador propio de los macrófagos. Esta expresión fue dependiente del periodo de incubación pero independiente de la naturaleza química de la partícula. Estos resultados llevaron a este grupo de investigación a especular con la posibilidad de que el osteoblasto, posea un fenotipo mixto en relación con el macrófago.

Algunos autores han sugerido que durante la diferenciación osteoblástica, una subpoblación de células podría verse involucrada en funciones inmunes, tales como, la fagocitosis y la activación de las células T. Así, cuando los osteoblastos están en contacto con microorganismos y materiales endoprotésicos, desarrollan funciones inmunológicas

para eliminarlos. Esta actividad, puede conllevar cambios a nivel morfológico, antigénico y bioquímico. Esta nueva función, puede ser importante en algunas situaciones como en procesos inflamatorios que van acompañados de la liberación de citoquinas. Éstas últimas, actuarían modulando y acentuando el fenotipo antigénico de los osteoblastos y, por tanto, su papel funcional inmunológico (presentación de antígeno y fagocitosis), el cual, podría, parcialmente, detener el proceso de diferenciación y maduración, por ejemplo, la formación ósea. Este proceso, es propuesto como un mecanismo de emergencia y no como un proceso fisiológico (Ruiz y col., 2003).

En relación con la anterior propuesta hay varios estudios que la confirman. Así la exposición, tanto de osteoblastos murinos como de osteoblastos humanos con dos patógenos bacterianos tan diferentes como Salmonella, una enterobacteria Gram negativa, y Staphilococcus aureus, un coco Gram positivo, produce un aumento de la expresión de moléculas de clase II (HLA-DR) y de la molécula coestimulante CD40 (Schrum y col., 2003a y Schrum y col., 2003b). Ambos microorganismos están frecuentemente asociados con enfermedades óseas. En relación al HLA-DR y al CD40, señalar que ambas moléculas juegan un papel importante en el mecanismo de activación de los linfocitos T y su expresión es propia de macrófagos y células dendríticas, en definitiva, de células presentadoras de antígeno. Por otra parte, los osteoblastos en cultivo expuestos a S. aureus y Salmonella secretan cantidades significativas de citoquinas proinflamatorias, factor estimulante de colonias y quimiocinas, las cuales, podrían actuar favoreciendo el reclutamiento de macrófagos, neutrófilos y linfocitos T al tejido óseo (Gasper y col., 2002; Bost y col., 2001; Bost y col., 2000). Todos estos datos sugieren que los osteoblastos juegan un papel importante en la iniciación de la activación de los linfocitos T en los lugares donde hay una infección en el hueso. Por lo tanto, los osteoblastos pueden desempeñar un papel importante en la iniciación de la respuesta inmune del huésped

después de la infección bacteriana del hueso (Schrum y col., 2003a y Schrum y col., 2003b).

### **3. INFLAMACIÓN**

La inflamación es la respuesta defensiva del organismo ante una agresión de cualquier naturaleza física, química, mecánica o biológica. Es por tanto, un mecanismo inmunológico inespecífico, que tiene como objetivo eliminar el agente causal, cicatrizar el tejido dañado y restablecer la función normal (García-Barreno, 2008; Feria, 2008). La respuesta inflamatoria está coordinada por un numeroso dispositivo de mediadores que se organizan en complejas redes reguladoras (García-Barreno, 2008).

Hay varias vías inflamatorias, cada una de las cuales, progresa a través de una cascada de procesos biológicos, por lo que, cada etapa en el proceso, tiene la propiedad de inducir las etapas subsecuentes y dar origen a una respuesta integrada. El conjunto de procesos particulares que tienen lugar durante una respuesta inflamatoria, dependen de múltiples factores: la naturaleza del estímulo desencadenante, su puerta de entrada y las características del huésped (Pape y col., 2010).

En los procesos infecciosos, en donde el daño tisular es de naturaleza biológica, la inflamación es una respuesta elemental, pero rápida, de defensa frente a la infección que precede y prepara la respuesta específica. En esta respuesta inmunológica, tiene lugar la liberación de mediadores, que son los responsables de los cambios vasculares que acompañan a la respuesta inflamatoria, y que a su vez, originan los signos típicos de la inflamación: tumor, rubor, calor y dolor (García-Barreno, 2008; Pérez-Ruiz y col., 2002; Díaz-Rubio y Espinós, 1994).

La inflamación es, por tanto, una respuesta fisiológica, aunque en determinadas circunstancias se puede hacer patológica como en la inflamación crónica (Algarrada y col., 2001).

### **3.1. Fases de la inflamación.**

En la inflamación, tienen lugar una serie de fases sucesivas. En la primera de ellas, como consecuencia del traumatismo, el mastocito se degranula, liberando un número importante de mediadores de la inflamación (histamina, heparina, kininogenasas y factores quimiotácticos, entre otros). Algunos, actúan sobre las células endoteliales que tapizan internamente los vasos, aumentando la permeabilidad.

Ésto permite que en una primera etapa pasen moléculas circulantes de la sangre como anticuerpos, factores del complemento o proteínas de la fase aguda, hacia el foco inflamatorio, o lo que es lo mismo, al tejido que ha sufrido el traumatismo. Las células endoteliales activadas por los mediadores de la inflamación, expresan determinadas moléculas de adhesión que se unen a sus ligandos expresados por los leucocitos que circulan por la sangre y determinan, en una fase tardía, la llegada de estos leucocitos al foco inflamatorio.

Las moléculas y leucocitos atraídos hasta el tejido que ha sufrido el traumatismo, desarrollan sus funciones inmunológicas en dicho foco. La respuesta inflamatoria, es activada por citoquinas pro-inflamatorias, tales como la IL-1, IL-6 o el TNF (Kulinsky, 2007) y citoquinas de inmunidad celular TH1 como el IFN $\gamma$ , e inhibida por citoquinas de inmunidad celular TH2 como la IL-4, IL-10, TGF $\beta$ 1 y, glucocorticoides.

Una vez que el problema ha sido resuelto, en el caso de que la agresión sea de origen biológico y cuando la infección ha sido eliminada, 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, sobre todo en el tejido conjuntivo. Estas células producen fibras de la matriz extracelular e inducen la retracción de las heridas (Serhan, 2006).

### **3.2. Mediadores de la inflamación.**

En el proceso inflamatorio, participan conjuntamente células y moléculas.

El componente celular, está formado, según el orden de participación, por: los monocitos, los neutrófilos, los mastocitos, los macrófagos, los eosinófilos, las plaquetas, los linfocitos y las células endoteliales (Esplugues y Barrachina, 2008).

Las moléculas que participan en la inflamación son muy variadas y poseen distinta naturaleza química (Connell y McInnes, 2006; Abbas y Lichtman, 2006). Entre estos mediadores destacan los siguientes:

- Proteínas plasmáticas, como son las del sistema del complemento, las kininas, o las proteínas fibrinolíticas y de la coagulación.
- Mediadores lipídicos o mediadores de *novo* sintetizados *in situ*, como las prostaglandinas (PGs), los tromboxanos (TXs), leucotrienos y lipoxinas.
- Péptidos y Aminas, como histaminas, serotonina, quimioquinas y citoquinas (IL-1, IL-6, IL-12, TGFβ1)

#### **4. LOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS.**

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), comprenden un grupo heterogéneo de medicamentos, la mayoría de los cuales son ácidos orgánicos con acciones antiinflamatoria, analgésica, antipirética y anti-agregante plaquetaria. Estos medicamentos son comúnmente usados por tener un amplio rango de aplicación en la práctica clínica, tanto en el tratamiento de dolencias musculoesqueléticas, como en otra gran gama de indicaciones debido a dichas acciones. Sin embargo su uso se ve limitado por la posible aparición de efectos adversos, potencialmente letales, como puede ser la enfermedad ulcerosa péptica o la insuficiencia renal. Tanto su efecto terapéutico como su potencial de toxicidad se deben a la inhibición de la enzima ciclooxigenasa (COX) y, en consecuencia, a la inhibición de PGs y TXs. Ante la necesidad de reducir sus efectos gastroerosivos se han desarrollado nuevos fármacos, antiinflamatorios selectivos de la COX-2 que, manteniendo sus propiedades terapéuticas, producen menores efectos adversos a nivel gastrointestinal (Boursinos, 2009; Vallano, 2002).

La inflamación es una respuesta de carácter protector contra los agentes agresores, no obstante en ocasiones, la reacción inflamatoria puede ser perjudicial por su propio mecanismo de acción, de modo que los AINEs potencian los efectos beneficiosos de la inflamación controlando al mismo tiempo sus secuelas nocivas, de manera que sea útil para localizar y aislar, al mismo tiempo que curar y reconstruir al tejido lesionado (Pérez-Ruiz, 2002).



#### 4.1. Mecanismo de acción.

Cuando hay un daño en la membrana celular, la enzima fosfolipasa  $A_2$  actúa hidrolizando los enlaces éster presentes en los fosfolípidos de membrana, lo que lleva a la liberación del ácido araquidónico (Boursinos, 2009; Hilário y col., 2006, Kudo y col, 1993). El ácido araquidónico libre al metabolizarse se transforma en leucotrieno, a través de la acción de la enzima lipoxigenasa, y en PGs, TXs y prostaciclina por medio de la acción de la COX (Hilário, 2006; Narumiya y Fitzgerald, 2001; Smith y col., 1992).

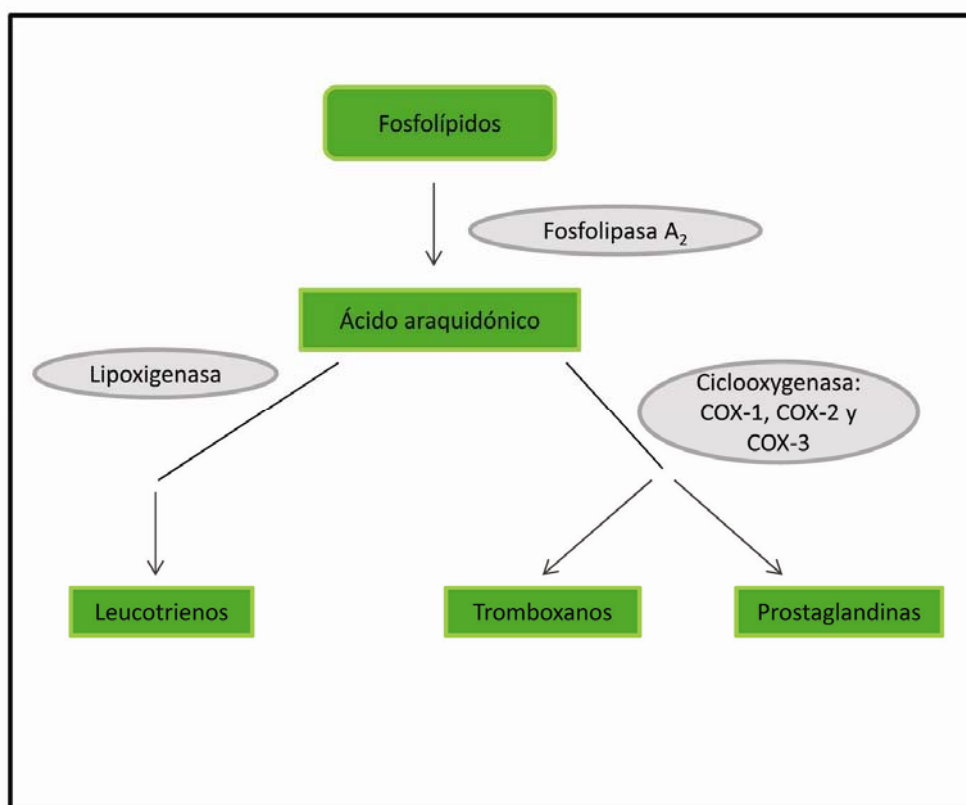


Figura 2. Mecanismo de acción de los AINEs

La COX, está compuesta por tres isoenzimas: COX-1, COX-2, y COX-3. Su consecuente bloqueo por los AINEs interfiere en la producción de PGs y TXs, mediadores de la inflamación que originan, entre otros, dolor y fiebre (Fracon, 2008; Hilário y col., 2006; Vallano, 2002). Este enzima, tiene una porción que presenta una disposición

tridimensional en el espacio complementaria a la del AINE que puede encajar en ella (Radi y Khan, 2005; Kiefer y col, 2000). La unión del AINE a la COX, le confiere un cambio estructural a la enzima que anula su acción en la cascada del ácido araquidónico, evitando la síntesis de PGs que actúan como mediadores de inflamación y favorecedores de la transmisión del estímulo nervioso.

Las tres isoenzimas, se expresan en circunstancias fisiológicas, pero existen diversos procesos inflamatorios, donde la expresión de la COX-2, aumenta hasta 20 veces, mientras que la expresión de la COX-1 no se afecta o lo hace en menor grado entre 2 y 3 veces (Feria, 2008).

La COX-1, tiene característica de enzima constitutiva y su actividad tiene que ver con la participación de las PGs y TXs en el control de funciones fisiológicas (Fracon, 2008; Hilário y col., 2006; Si-Young y col., 2005; Vallano, 2002; Smith y col., 2000). En cambio la COX-2, tiene características de enzima inducible en determinadas células bajo circunstancias patológicas (por ejemplo en macrófagos, monocitos, células endoteliales y sinoviales en el curso de un proceso inflamatorio), y está inducida fuertemente, por distintas citoquinas y factores de crecimiento (Simon, 2005; Vallano, 2002; Williams y col., 1999).

La COX-1, se encuentra perfectamente asociada al retículo endoplasmático, y se expresa constitutivamente en la práctica totalidad de los tejidos, especialmente, en plaquetas, células endoteliales, tracto gastrointestinal, microvasculatura renal, glomérulos y túbulos colectores; mientras que la COX-2 se asocia en mayor medida a la envoltura nuclear (Fracon, 2008; Hilário y col., 2006; Radi y Khan, 2005).

La COX-2 es la enzima más implicada en la regulación de la síntesis de PGs como respuesta a distintos factores de resorción ósea; tales como el FGF-b, la IL-1 y la PGE<sub>2</sub>

(Onoe y col., 1996; Harrison y col., 1994). La importancia terapéutica que representaría disponer de un inhibidor selectivo de la COX-2, reside en el hecho de poder utilizarlo en el tratamiento de procesos inflamatorios, sin ocasionar ninguna de las reacciones adversas gastrointestinales o renales que caracterizan a los AINEs clásicos (Simon, 2005).

La COX-3 es una variante de la COX-1, que deriva de los mismos genes (Botting y Ayoub, 2005), y comparte todas las características catalíticas de COX-1 y COX-2 (Muñoz, 2010; Warner y Mitchell, 2004). Está presente principalmente en el cerebro y en la medula espinal (Kis y col., 2003). Actualmente no se conoce exactamente el papel que desempeña, pero hay evidencias que sugieren que la COX-3 actúa en la sensibilidad del dolor y en la regulación de la temperatura corporal a nivel hipotalámico (Botting y Ayoub, 2005), esta idea se basa en estudios que se centraron en el mecanismo de acción del Paracetamol, evocado como inhibidor de la COX-3 (Chadrsekharan, 2002), lo que podría explicar su efecto antipirético y analgésico, debido a una disminución de la PGE<sub>2</sub> por inhibición de la COX-3 a nivel del sistema nervioso central (Sobolewski y col., 2010; Botting y Ayoub, 2005).

El mecanismo de acción de los AINEs se caracteriza por interferir en la producción de ciertas PGs en forma de eicosanoides, el cual, tiene varios efectos en los vasos sanguíneos y en las terminaciones nerviosas, con un papel sensibilizador de los neuroreceptores, y en las células inmersas en los procesos antiinflamatorios (Harder, 2003; Pérez-Ruiz, 2002).

Este es el punto en el que actúan los AINEs por interferencia con la actividad de la enzima COX, inhibiendo la producción de PGs. No obstante, cada familia de AINEs presenta un mecanismo diferente de inhibición de la COX (Hilário, 2006). Así, los AINEs de primera generación inhiben a ambas COX (1 y 2), mientras que los AINEs de nueva

generación inhiben de manera más específica la COX-2 (Simon y O'Connor, 2007; Gestenfeld y col., 2007). Por ejemplo, el Ibuprofeno y Naproxeno inhiben irreversiblemente a ambas COX; el Celecoxib inhibe de manera específica la COX-2 y el Paracetamol bloquea la COX por retención de radicales libres y por inhibición de la COX-3 (Frendrick y Greenberg 2009).

En general, los AINEs tienen un uso clínico en cefaleas, artralgias, mialgias u otros dolores moderados. Como la gran mayoría de los fármacos, presentan efectos secundarios, y los más frecuentes se deben, principalmente, a la inhibición de la COX (Fracon, 2008; Hilário y col., 2006; Vallano, 2002).

#### **4.2. La acción farmacológica.**

Los AINEs presentan una serie de acciones farmacológicas con interés terapéutico, entre las que se encuentra la analgésica, antipirética, antiinflamatoria, antiagregante plaquetario, o la uricosúrica

La acción analgésica de los AINEs tiene lugar a nivel periférico mediante la inhibición de la síntesis de PGs producidas en respuesta a una agresión o lesión tisular, impidiendo que los eicosanoides, a través de su acción sensibilizadora, contribuyan a aumentar la acción estimulante del dolor de otros mediadores como la histamina o bradiquina, que se liberan.

Su actividad analgésica es de intensidad media, por lo que son útiles en dolores articulares, musculares, dentarios o cefaleas de etiología diversas (Feria, 2008). Incluso, la actividad antiinflamatoria, contribuye a disminuir la cascada de producción, liberación y acceso de sustancias que pueden sensibilizar directamente las terminaciones sensitivas. A

medida que los AINEs controlen este proceso junto a la infiltración celular, se manifestará en mayor medida la acción analgésica (Feria, 2008).

Otras de sus acciones es la antitérmica, ya que reducen la temperatura corporal en estados febriles, principalmente por su capacidad de disminuir las concentraciones de PGE<sub>2</sub> mediante la acción directa de la actividad enzimática COX-2. Las PGs actúan como mediadores en la producción de fiebre a nivel del hipotálamo, dónde se localiza el centro regulador de la temperatura corporal; este aumento de PGE<sub>2</sub> a nivel hipotalámico es debido a la acción de las citoquinas, interleukinas, y el IFN  $\alpha$  y  $\beta$  (Florez, 2008).

La capacidad de reducir la inflamación por parte de los AINEs es, junto a su actividad analgésica, la más valorada terapéuticamente hablando. Su efecto antiinflamatorio varía dependiendo del tipo de proceso, de la participación de los eicosanoides en él, y de la posibilidad de que actúen a través de mecanismos de acción independientes de la inhibición de las COXs. La eficacia de la acción antiinflamatoria depende del grado de participación de las PGs en la inflamación, y de la capacidad de estas sustancias de interferir con los mecanismos de la inflamación no dependientes de estas sustancias (Fracon, 2008; Hilário y col., 2006; Feria, 2008).

Como consecuencia de su efecto inhibitor sobre la COX-1, los AINEs poseen propiedad antiagregante. 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 descenso de los niveles de TXA<sub>2</sub> plaquetario, responsable de parte de los mecanismos que provocan la agregación plaquetaria (Schafer, 1995). Por ello, se utilizan los AINEs en la prevención de los accidentes tromboembólicos coronarios y cerebrales, aunque puede devenir como reacción adversa la aparición de hemorragias (Morita y Schindler, 1995).

La acción farmacológica uricosúrica de los AINEs se debe a la inhibición del transporte del ácido úrico desde la luz del túbulo renal hasta el espacio intersticial. Es un proceso de competencia en el transporte de ácidos orgánicos que sólo es apreciable con algunos AINEs, por ejemplo, a dosis elevadas de salicilato, fenilbutazona y sulfinpirazona. Esto no limita la utilidad de otros AINEs en el tratamiento del ataque de gota, que a dosis altas son útiles por su acción analgésica y antiinflamatoria (Feria, 2008).

Recientemente, se ha visto que la enzima COX se sobreexpresa en diversas situaciones patológicas, como en células transformadas, por lo que surgen nuevas indicaciones terapéuticas para los AINEs como fármacos con actividad anticancerígena. Por ejemplo, la COX-2 se encuentra sobreexpresada en los tumores malignos, por lo que se pueden utilizar los AINEs como tratamiento coadyuvante de adenomas y carcinomas (Sobolewski y col., 2010). En pacientes con metástasis de tumores sólidos, también se ha demostrado actividad anticancerígena de los AINEs (Axelsson, 2010), siendo atribuido el mecanismo de acción a la inhibición de la COX-1 y la COX-2. Varios estudios, *in vitro*, sugieren que el Ibuprofeno puede disminuir el crecimiento del cáncer de pulmón de células pequeñas (Andadre y col., 2000). Datos que se corresponden con diferentes estudios epidemiológicos en los que se observa que el uso regular y prolongado en el tiempo de Aspirina e Ibuprofeno, entre otros AINEs, protegen frente al desarrollo de muchos tipos de cáncer, entre los que destacan los gastrointestinales y de ovarios (Liao y col., 2011; Harris y col., 2005).

Junto a los AINEs anteriormente citados, se suman nuevos AINEs que muestran efectos sobre distintos tipos de células cancerígenas. Así, el Meloxicam ha mostrado actividad antitumoral sobre células cancerígenas de colon, pulmón y hueso (Sobolewski y col., 2010; Naruse y col., 2006). Lo mismo ocurre con el Celecoxib, que inhibe la

proliferación celular en células de osteosarcoma humano (Wang y col., 2004). Además se ha visto que los AINEs inhibidores específicos de la COX-2 y ciertos AINEs no específicos, inducen la apoptosis e inhiben la proliferación celular de diferentes y numerosas líneas tumorales, disminuyendo así la capacidad de metástasis (Sobolewski y col., 2010; Naruse y col., 2006).

### **4.3. Reacciones adversas.**

Los AINEs ejercen su actividad antiinflamatoria a través de la inhibición de la COX-2 en el sitio de la inflamación. Pero también estos fármacos son capaces de inhibir la COX-1 en los tejidos gastrointestinal y renal, lo que genera efectos no deseados (Pérez-Ruiz, 2002). Es por esta razón que los AINEs están asociados con una mortalidad y morbilidad significativa, particularmente en términos de efectos adversos a nivel gastrointestinal (Green y col., 2001).

Por tanto, los AINEs muestran efectos secundarios a nivel gastrointestinal, renal, hematológico, e incluso desencadenan reacciones de hipersensibilidad.

La lesión en el aparato digestivo, se produce como consecuencia de los efectos tóxicos directos del fármaco, pero los más importantes derivan de sus efectos sistémicos que incluyen los derivados de la inhibición de la síntesis de PGs endógenas y otros citotóxicos mediados por neutrófilos y citoquinas (Prieto 2007; Kelly y col., 1996).

El efecto regulador del flujo sanguíneo y la protección gástrica, está mediado por la COX-1, aunque parece que la COX-2 también podría estar implicada (Hirata y col., 1997). El efecto inhibitor de los AINEs sobre la COX-1 produce la inhibición de las PGs, las cuales, son necesarias para mantener íntegra la mucosa gástrica (Warner y col., 1999). Por

ello, los inhibidores selectivos de la COX-2 se asocian a una menor toxicidad, debido a que la COX-2 no se expresa en la mucosa gástrica en condiciones habituales, aunque sí en la fase cicatricial de la úlcera péptica. Los AINEs también pueden ejercer un efecto irritante o erosivo sobre la mucosa gástrica, debido a que algunos de ellos poseen la capacidad de convertirse en liposolubles a un pH bajo (Hawkins y Hanks, 2000).

Las PGs desempeñan un papel muy importante en la funcionalidad del aparato renal, modulan el tono vascular y la homeostasis hidrosalina. La inhibición de la síntesis de PGs, debido a la ingesta de AINEs, impide el efecto vasodilatador de éstas sobre la arteria renal, pudiendo alterar la filtración glomerular de manera reversible y/o promoviendo la retención de agua, sodio y potasio. También se puede producir la llamada neuropatía analgésica, por lesión directa del tejido renal, especialmente con el consumo prolongado (Rang y col., 2003; Aranza y col., 2004). Sí previamente a la ingesta del fármaco, la función renal se encuentra deteriorada puede presentarse una insuficiencia renal aguda. Los inhibidores selectivos de COX-2 pueden producir deterioro de la función renal en pacientes que presenten una insuficiencia cardíaca congestiva, con depleción de volumen, con patología renal previa, hiponatremia, hipoalbuminemia, enfermedad hepática o que estén sometidos a tratamiento con diuréticos, (Whelton y col., 2000; Rossat y col., 1999).

La mayoría de las reacciones hematológicas, cuya frecuencia es baja, se deben a fenómenos en los que intervienen mecanismos inmunitarios como la agranulocitosis, la anemia aplásica, la trombocitopenia y la anemia hemolítica (Feria, 2008). A nivel hematológico, es bien conocido que algunos AINEs, como la aspirina, inhiben de manera irreversible la agregación plaquetaria (Martindale, 2000).

Finalmente, las reacciones de hipersensibilidad observadas como consecuencia del tratamiento con AINEs, probablemente están relacionadas con la inhibición de la síntesis



de PGs en conexión con una sensibilidad individual. Esta hipersensibilidad se manifiesta fundamentalmente con rinitis alérgicas, hipotensión, asma bronquial y shock anafiláctico. Si bien, cabe señalar que estas reacciones presenta una escasa incidencia, afectando al 2% de los paciente sometidos a un tratamiento antiinflamatorio (González y col., 2002).

#### **4.4. Clasificación según Grupo farmacológico.**

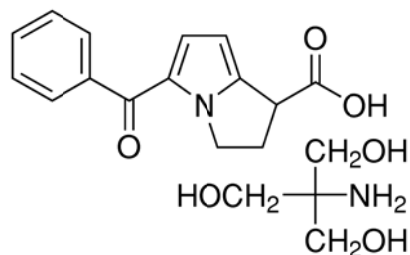
Los AINEs se clasifican según su grupo farmacológico en: (ver tabla 1)

A) Derivados del ácido acético: son fármacos que comparten diversos anillos (indólicos, pirrólicos, fenilos o piranoindólicos) conteniendo ácido acético. Existen diversas series de derivados:

- *Indolacético*: Indometacina, es un inhibidor de la COX-1 y COX-2; sus acciones farmacológicas son similares a las del Ácido acetilsalicílico (AAS), presentando una poderosa actividad antiinflamatoria, antipirética y analgésica, muy eficaz en el tratamiento de gota como antiinflamatorio. Aunque su eficacia como antiinflamatorio es muy notable, su uso se ha visto limitado por la alta incidencia de efectos secundarios intolerables, a veces irreversibles y potencialmente fatales.

-*Pirrolacético*: Ketorolaco, muy eficaz y elevado poder analgésico. Posee efecto antipirético y moderada eficacia antiinflamatoria e inhibe la agregación plaquetaria.

-*Fenilacético*: Diclofenaco, es inhibidor de la COX-2, inhibe la síntesis de PGs pero, además, disminuye la concentración de ácido araquidónico en leucocitos; de amplio uso en nuestro país, posee actividad analgésica, antipirética y antiinflamatoria.

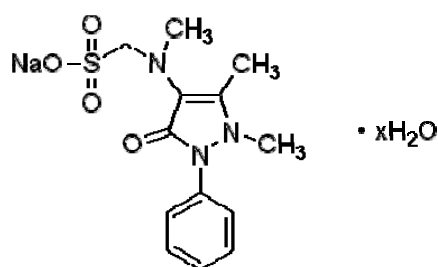


*Ketorolaco*

B) Derivados del ácido antranílico: también denominados fenamatos. Sus propiedades farmacológicas son similares a las de otros grupos, aunque con el Mefenámico y Meclofenámico, los efectos sobre la agregación plaquetaria son menos importantes que con la mayoría del resto de los AINEs (Chu y col., 2003).

Las reacciones adversas más frecuentes afectan al aparato digestivo superior, aunque también son frecuentes la diarrea profusa, acompañada de esteatorrea e inflamación intestinal, y los vómitos, que pueden inducir una deshidratación e insuficiencia renal. Somnolencia, cefaleas y mareo, pueden aparecer con cierta frecuencia (Conroy y col., 1991).

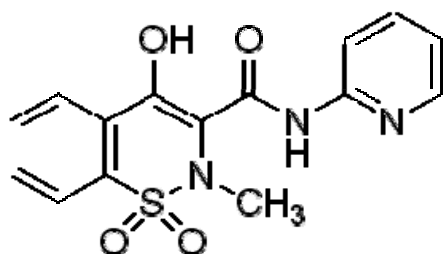
C) Derivados pirazólicos: dentro de este grupo está el Metamizol, la Propifenazona que se emplea con fines preferentemente analgésicos y antipiréticos, y la Fenilbutazona con fines antiinflamatorios y analgésicos.



*Metamizol*

En el Metamizol la dosis analgésica, es dosis dependiente, comparable a la dosis baja de opiáceos. En su acción analgésica, existe un componente de acción central, quizás más importante que el periférico sobre la COX. Dicho efecto analgésico es comparable con el del Ácido Acetilsalicílico (AAS) y superior al paracetamol, a igualdad de base y vía de administración. También se utiliza en el tratamiento de la fiebre elevada que no responde a otros antipiréticos (Feria, 2008).

D) Oxicams: son ácidos enólicos introducidos en terapéutica como AINEs de vida media larga, que permiten una sola toma diaria, algo especialmente importante en el tratamiento de procesos inflamatorios y dolorosos crónicos. Los más utilizados son el Piroxicam, Tenoxicam y Meloxicam. Todos ellos muestran actividad antiinflamatoria, analgésica, antipirética y antiagregante plaquetaria. Están indicados para el tratamiento sintomático, agudo o crónico de las artritis (Salvi y Lang, 2005).

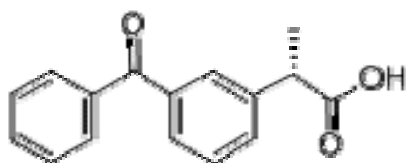


*Piroxicam*

Las reacciones adversas más frecuentes son las de localización gastrointestinal (hasta un 25%). Con menos frecuencia pueden producir alteraciones neurológicas (sedación, somnolencia, mareo, cefaleas) y tienen un mayor riesgo de alteraciones en la función renal.

E) Derivados del ácido propiónico: son derivados del ácido fenilpropiónico y forman un grupo farmacológico bastante homogéneo. El primero de la serie fue el Ibuprofeno, al

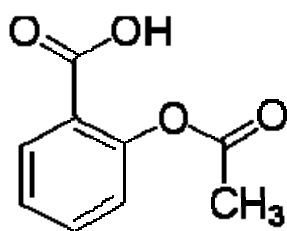
que le siguieron el Naproxeno, Fenoprofeno, Ketoprofeno, Flurbiprofeno, Ácido tiaprofénico y Osaprocina. Son antiinflamatorios de eficacia moderada y su mecanismo de acción es inhibir la COX-1 y la COX-2. Sus reacciones adversas son cualitativamente semejantes a las de otros AINEs, aunque su uso se asocia a una menor incidencia de problemas gastrointestinales, no presentan problemas hematológicos, producen pocas molestias neurológicas y también pueden aumentar el tiempo de hemorragia debido a su acción antiagregante (Feria, 2008).



*S-Ketoprofeno*

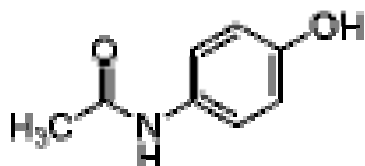
F) Salicilatos: Utilizados en terapéutica, son productos de síntesis que comparten como núcleo fundamental el ácido salicílico, el cual, resulta ser irritante y por ello sólo se puede utilizar de forma externa.

Entre los más utilizados en la clínica destacan: AAS, el cual, se metaboliza rápidamente a ácido salicílico, que inhibe débilmente, *in vitro*, la producción de PGs. *In vivo*, el salicilato sódico, posee, menor eficacia analgésica, pero similar eficacia antiinflamatoria que el AAS, al inhibir la transcripción de la COX-2. El AAS, muestra una marcada actividad antiagregante plaquetaria a dosis inferiores a las analgésicas y, a concentraciones elevadas, interfiere en la síntesis de protrombina (Feria, 2008).



*Ácido Acetilsalicílico*

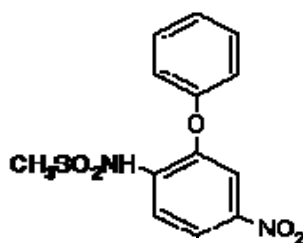
G) Paraaminofenoles: son derivados de la anilina, entre los que se encuentran el Paracetamol, el Proparacetamol y la Fenazopiridina.



*Paracetamol*

El Paracetamol tiene una leve actividad antiinflamatoria, pero a pesar de ello, se ha demostrado una reducción en tejidos inflamados tras cirugía dental (Skjelbred y Lokken, 1979; Graham y col., 2001). Tiene una eficacia analgésica y antipirética comparable a la del AAS (Mehlich y Frakes, 1984). Su mecanismo de acción es hoy aún objeto de debate, ya que puede estimular la síntesis de PGs a nivel de la mucosa gástrica (Danon y col., 1983), no modificarla en pulmón y plaquetas, (Boutaud y col., 2002; Tolman y col., 1983) o inhibirla moderadamente a nivel del sistema nervioso central (Chadrsekharan, 2002; Ruth-Selbach y col., 1999). Posee una alta tolerabilidad y está especialmente recomendado para personas con intolerancia al AAS y con alto riesgo de complicaciones gastrointestinales (Prescott, 2000), sin embargo, carece de propiedad anticoagulante.

H) Inhibidores de la COX-2: La Nimesulida, inhibidor preferencial de la COX-2, es una sulfoanilida, con actividad analgésica (similar al Ibuprofeno y superior a la Indometacina), antiinflamatoria (similar a la de la Indometacina, Diclofenaco, Piroxicam o Ibuprofeno) y antipirética (superior a la de la Indometacina, Aspirina, Ibuprofeno o Paracetamol) (Capone y col., 2007). Se absorbe rápidamente y de forma casi completa por vía oral. Su espectro de efectos secundarios, no se diferencia de otros AINEs. Es especialmente útil en pacientes hipersensibles a la AAS o a otros AINEs y en pacientes asmáticos (Senna y col., 1996)



*Nimesulida*

Tabla 1. Clasificación de los AINEs (Flórez, 2008).

<b>Grupo farmacológico</b>	<b>Fármaco</b>
<b>ÁCIDOS</b>	
<b>Acético:</b>	
Fenilacético	Diclofenaco
Indolacético	Indometacina
Pirrolacético	Ketorolaco
<b>Antranílico</b>	Ácido mefenámico
<b>Enólicos</b>	
Pirazolona	Metamizol
Pirazolidindioras	Fenilbutazona
Oxicams	Peroxicam, meloxicam
<b>Nicotínico</b>	Clonixina
<b>Propiónico</b>	Ibuprofeno, Naproxeno
<b>Salicílico</b>	Ácido acetilsalicílico
<b>NO ÁCIDOS</b>	
<b>Paraaminofenoles</b>	Paracetamol
<b>INHIBIDORES DE LA COX-2</b>	
<b>Metilsulfonilfenilo</b>	Etoricoxib
<b>Sulfonamida</b>	Celecoxib
<b>Sulfonilpropanamida</b>	Parecoxib

## 5. OSTEOLASTOS Y AINEs

Los AINEs constituyen unos de los grupos de fármacos que presentan más variedad de indicaciones terapéuticas, debido a sus efectos analgésicos, antipiréticos y antiagregantes, mostrándose de gran utilidad en el tratamiento de patologías óseas (dolencias esqueléticas, intervenciones quirúrgicas, fracturas) (Hilário y col., 2006; Etcheverry y col., 2002).

Numerosos estudios han demostrado que ciertos AINEs pueden alterar el crecimiento, el remodelado e incluso la reparación del hueso, por lo que junto a sus efectos farmacológicos hay también unos efectos adversos sobre el tejido óseo. Dichos efectos secundarios son poco conocidos, y por tanto, no son valorados a la hora de administrarlos en el tratamiento de patologías óseas (Pape y col., 2010; Kawaguchi y col., 2000; Ho y col., 1995). Por ello, en los últimos años distintos grupos de investigación se han centrado en determinar los distintos efectos que estos fármacos ejercen sobre el tejido óseo y el mecanismo por el que lo llevan a cabo, dada la trascendencia clínica del tema.

Los primeros estudios sobre el efecto adverso de los AINEs sobre el tejido óseo se centraron en la inhibición en la síntesis de PGs, como consecuencia del efecto inhibitor de los AINEs sobre la enzima COX, enzima con un papel central en la síntesis de las PGs. Dado que las PGs son reguladores del metabolismo esquelético, están implicadas en la modulación de la proliferación y la diferenciación osteoblástica. Esta modulación es ejercida por la interacción con sus receptores específicos, expresados en la superficie celular del osteoblasto. Estas células, no sólo se muestran como células diana para dichos reguladores, sino que incluso son capaces de sintetizarlos, lo que explicaría el hecho de que la síntesis de PGs sea un proceso autorregulable (Bourismo y col., 2009; Kawaguchi y col., 2000; Pilbeam y col., 1995).



Como se ha comentado anteriormente, la síntesis de PGs se realiza gracias a la acción catalítica de la enzima COX, al actuar sobre el ácido araquidónico. En los osteoblastos la COX-1 es un enzima constitutivo, expresada en el hueso normal y en el sitio de la fractura (Pape y col., 2010; Gerstenfeld y col., 2003); mientras que la COX-2 es un enzima inducible, esto explica que no se detecte o se detecte en muy bajas concentraciones en osteoblastos que no han sido sometidos a estimulación. No obstante, su expresión o síntesis aumenta de forma importante en determinadas situaciones, tales como: estados iniciales del proceso de reparación del hueso (Gerstenfeld y col., 2003), procesos inflamatorios (Muñoz y col., 2010) y cáncer (Sobolewski y col., 2010). La producción de PGs regulada por fuerzas mecánicas, hormonas, citoquinas y factores de crecimiento, parece estar controlada por los efectos de la enzima inducible COX-2, mientras que la isoenzima COX-1, parece desempeñar un papel importante en la respuesta inicial tras la liberación del ácido araquidónico. Los datos presentan a la isoenzima COX-2, como el principal regulador de la renovación ósea, en respuesta a citoquinas, hormonas, fuerzas mecánicas, factores de crecimiento y promotores tumorales (Radi y Khan, 2005).

Algunos autores sugieren que el mecanismo de acción de los AINEs para provocar la inhibición de la reparación ósea es, mediante el bloqueo de la síntesis de PGs, especialmente PGE<sub>1</sub> y la PGE<sub>2</sub> por la vía de la COX (Chang y col., 2005; Ho y col., 1999). En este sentido, se sabe que estos fármacos inhiben la síntesis de PGs en osteoblastos, como es el caso del Ketorolaco, que provoca una inhibición de la reparación y el remodelado óseo, disminuyendo la proliferación celular, como lo demuestran diversos estudios realizados en animales de experimentación (Ho y col., 1995; Buckley y Brogden, 1990). También es sabido que el Ketorolaco suprime la reparación del hueso fracturado e inhibe la remodelación de hueso intacto (Ho y col., 1995); además, sus efectos sobre el hueso tienen lugar en las etapas tempranas de la reparación de la fractura (Ho y col., 1999).

En esta misma línea, Van Staa y col., (2000) demuestran en su estudio, que los pacientes que toman AINEs tienen mayor riesgo de sufrir una fractura que los que no los toman. También se ha observado, que estos fármacos disminuyen el crecimiento óseo entorno a implantes ortopédicos y retrasan la formación del callo óseo, en pacientes con fracturas (Giannoudis y col., 2000).

Estudios más recientes sugieren que la deficiencia o inhibición de la COX-2 dificulta la curación del hueso fracturado, efecto que se acentúa en las etapas tempranas del proceso, tal y como indicaron con anterioridad Ho y col. (1999), pero además, describen que la magnitud del efecto está en relación con la duración del tratamiento (Vuolteenaho y col., 2007). Por otra parte, distintos estudios muestran que la COX-2 puede jugar un rol importante en la regulación de la diferenciación celular de las células madres mesenquimales, lo que podría repercutir en la curación de las fracturas en etapas tempranas de la reparación ósea (Simon y O'Connor, 2007; Daluiski y col., 2006).

En ensayos clínicos se ha observado que los inhibidores selectivos de la COX-2 son efectivos en la prevención de osificación después de la intervención quirúrgica de prótesis de cadera, concluyendo que en la terapia reparadora del tejido óseo, mediante el uso de material protésico, la administración de AINEs disminuye en un 59% el riesgo de osificación (Saudan y col., 2007; Romano y col., 2004).

No obstante, hemos de tener en cuenta que hay otros estudios epidemiológicos que muestran que aquellos individuos que son tratados con ciertos AINEs tienen una mayor masa ósea que cuando se compara con pacientes que no reciben esos tratamientos, incluso experimentan una reducción considerable en los valores de marcadores de resorción de hueso (Morton y col., 1998; Lane y col., 1997).

En general, la mayoría de los estudios clínicos realizados sugieren que los AINEs selectivos retrasan la curación de las fracturas (Pape y col. 2010; Xie y col., 2008; Simon y O'Connor, 2007; Beck y col., 2003). No obstante, otros autores apoyan la idea de que es precisamente ese efecto inhibitor de la síntesis de PGs el que protege frente a la pérdida de hueso en ciertas situaciones patológicas (Armour y col., 2001).

Junto a los estudios *in vivo* hay distintos ensayos *in vitro* que han demostrado que los AINEs suprimen la proliferación en los osteoblastos, frenando su ciclo celular e induciendo la muerte celular por apoptosis, (Chang y col., 2005; Ho y col., 2001; Ho y col., 1999). La acción de los AINEs sobre el osteoblasto se extiende a otros parámetros celulares como la AP y la síntesis de colágeno tipo I, los cuales se ven aumentados ligeramente, sobre todo en las etapas tempranas de la diferenciación osteoblástica como consecuencia del tratamiento con AINEs (Ho y col., 1999).

Cuando los estudios utilizan como modelo de osteoblasto, células de osteosarcoma humano, observan que su tratamiento con Indometacina provoca una inhibición significativa sobre la proliferación celular de forma dosis dependiente tras 48 horas de tratamiento (Evans y Butcher, 2004); estos resultados vienen a corroborar los ya obtenidos por otros autores en cultivos primarios de osteoblastos (Min y col., 1998); y guardan relación con muchos de los estudios clínicos anteriormente citados (Giannoudis y col., 2000).

El mecanismo mediante el cual los AINEs ejercen su efecto sobre el crecimiento celular del osteoblasto, aún está en discusión y mientras que algunos autores lo atribuyen a la inhibición de la síntesis de PGs (Simon y O'Connor, 2007), otros consideran que es como consecuencia de su acción sobre el ciclo celular y/o mediante la inducción de apoptosis de esta población celular (Chang y col., 2009; Zhang y col., 2000).

Además, distintos estudios revelan que los AINEs poseen, junto al efecto inhibitorio sobre la proliferación celular del osteoblasto, capacidad para modular otros parámetros celulares, tales como el perfil antigénico o la capacidad fagocítica. Si bien, el efecto observado sobre estos parámetros varía en función del AINE utilizado y con la población de osteoblastos estudiada (Díaz-Rodríguez y col., 2012; García-Martínez y col., 2011; Díaz-Rodríguez y col., 2010).

Todos los hallazgos encontrados en la bibliografía, bien en estudios clínicos, *in vivo*, o bien en estudios con cultivos celulares, *in vitro*, correlacionan la inhibición de la proliferación y la muerte celular de los osteoblastos causados por los AINEs y el efecto inhibitorio de los AINEs en la remodelación ósea *in vivo*. Y dado que no hay unanimidad entre los científicos sobre los efectos y el mecanismo de acción de los AINEs sobre el osteoblasto, ni si el efecto observado de algunos AINEs sobre el osteoblasto se extiende a los restantes AINEs, es por lo que consideramos necesario profundizar en este campo de investigación dada la gran trascendencia clínica de los AINEs en relación con el tejido óseo.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## **JUSTIFICACIÓN**

Los antecedentes bibliográficos muestran un efecto adverso de los AINEs sobre el tejido óseo y más concretamente sobre las células responsables de la formación del hueso, el osteoblasto. Este hecho unido a que los AINEs son comúnmente utilizados en el tratamiento del tejido óseo por sus efectos analgésicos, antitérmicos y antiinflamatorio hace que consideremos de interés clínico conocer el efecto de distintos AINEs sobre los osteoblastos, tanto a nivel del crecimiento celular como a nivel de otros parámetros celulares y funcionales, en un intento de conocer su posible mecanismo de acción.

Además, la valoración de los resultados que se obtengan, pueden constituir una herramienta de utilidad clínica. Ya que, por una parte nos permitirá tener un mejor conocimiento del efecto de los AINEs sobre el tejido óseo, y por otra nos permitirá establecer unos criterios de elección, a la hora de tratar el tejido óseo en reparación; seleccionando aquel AINE que posea la acción farmacológica buscada y que carezca o posea el menor efecto adverso sobre el hueso.

## **HIPÓTESIS**

Los AINEs poseen un efecto adverso sobre los osteoblastos, disminuyendo su capacidad de crecimiento y pudiendo modular otros parámetros celulares, lo que tiene una repercusión negativa sobre tejido óseo en reparación.

## **OBJETIVOS**

De acuerdo con nuestra hipótesis, nos proponemos como objetivo de esta tesis, estudiar el efecto de cuatro AINEs (Ácido Acetilsalicílico o Aspirina, Dexketoprofeno, Ketorolaco y Metamizol), a distintas dosis y pautas de tratamiento, sobre diferentes aspectos fisiológicos del osteoblasto, tales como, crecimiento, diferenciación, adhesividad, expresión antigénica y fagocitosis. Para ello se utilizará como modelo celular, la línea de osteosarcoma MG63, línea que es comúnmente usada en el estudio del tejido óseo en general y del osteoblasto en particular.

La finalidad de este estudio es disponer de un criterio amplio que nos permita elegir el AINE más adecuado en cada caso para el tratamiento terapéutico de la inflamación ósea, y en especial, cuando haya fractura ósea o intervención quirúrgica que implique al hueso y requiera una rápida y adecuada reparación ósea.

## **MATERIAL Y METODOS**



## **1. Línea celular de osteoblastos humanos.**

Para este estudio, se utilizó la línea celular **MG63**. Es una línea tipificada de osteoblastos, que se obtuvo a partir de tejido óseo humano procedente de un varón caucásico de 14 años de edad con un osteosarcoma (ATCC: CRL-1427); la cual, fue proporcionada por la American Type Culture Collection (ATCC), a través del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. Ésta es comúnmente utilizada como modelo de osteoblasto en diferentes estudios de esta población celular.

## **2. Cultivo de la línea celular MG63.**

La línea celular MG63 se cultivó en frascos de 25 cm<sup>2</sup> de superficie (Falcom, Labware, Oxford, UK) con 10 ml de medio DMEM (Gibco, Cell Culture Products, Carlsbad, CA) suplementado con: L-Glutamina al 1% (Sigma Chem. Comp., St. Louis, Mo, USA), HEPES al 2% (Sigma Chem. Comp., St. Louis, Mo, USA), 2,5 µg/ml de Anfotericina B (Sigma Chem. Comp., St. Louis, Mo, USA), 100 UI/ml de Penicilina (laboratorios ERN S.A., Barcelona, España), 50 µg/ml de Gentamicina (Braun Medical S.A. Jaén, España) y suero bovino fetal (SBF) al 10% (Gibco, Paisley, UK), previamente descomplementado en un baño a 56°C durante 30 minutos. Las células se cultivaron en este medio a 37°C, en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% hasta conseguir un crecimiento semiconfluyente.

Esta línea celular, crece adherida a la superficie del frasco de cultivo, por lo que para su la utilización o subcultivo es preciso despegarlas de dicho frasco; para ello se utilizó 10 ml de una solución de Tripsina-EDTA (Sigma -Aldrich Co. Chem. Comp., St. Louis, Mo, USA), durante 10 min a 37°C. Transcurrido este tiempo la actividad enzimática se neutralizó con 20 ml de medio DMEM suplementado al 10% con SBF. La suspensión

celular obtenida se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos a 7°C. El sedimento obtenido se suspendió en medio de cultivo para su posterior uso.

### **3. Efecto de los AINEs sobre distintos parámetros de la línea celular MG63.**

Para este estudio se seleccionaron cuatro AINEs, en base a su utilidad en la práctica clínica en aquellas especialidades médicas en las que se requiere regeneración ósea como traumatología o cirugía maxilofacial. Dichos fármacos fueron: Dexketoprofeno (Sigma-Aldrich Co. Chem. Comp., St. Louis, Mo, USA), Ketorolaco (Sigma Chem. Comp., St. Louis, Mo, USA), Metamizol (Sigma Chem. Comp., St. Louis, Mo, USA) y Aspirina (Sigma Chem. Comp., St. Louis, Mo, USA).

La línea celular MG63 se trató con cuatro AINEs al objeto de determinar su efecto sobre distintos parámetros celulares tales como, el crecimiento celular, morfología, la diferenciación celular, adhesión, la expresión antigénica y la capacidad fagocítica.

#### **3.1. Efecto de los AINEs sobre el crecimiento celular.**

El efecto de las AINEs sobre el crecimiento celular se estudió mediante distintas técnicas. Se evaluó la capacidad proliferativa utilizando la técnica del MTT; el efecto sobre el ciclo celular, mediante citometría de flujo, la inducción de apoptosis mediante un método citométrico y una técnica de microscopía de fluorescencia, y por último, se analizó el posible efecto citotóxico mediante la cuantificación de la lactato deshidrogenasa libre por colorimetría.

### 3.1.1. Estudio de la proliferación celular.

El estudio del efecto de los AINEs sobre la capacidad proliferativa se realizó mediante la técnica espectrofotométrica del MTT (Thiazolyl blue Tetra-zolium Bromide 97.5% TLC, Sigma Chem. Comp., St. Louis, Mo, USA). Dicha técnica mide respiración celular y se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, a formazan (producto de color púrpura) por parte de las células viables.

Las células suspendidas en medio de cultivo con SBF al 10% y ajustadas a una concentración final de  $1 \times 10^4$  células/ml, se dispusieron en placas de cultivo de 96 pocillos (Falcom, Becton Dickinson Labware, N.J.), conteniendo 200  $\mu$ l cada uno. Dichas placas fueron incubadas a 37°C en estufa de CO<sub>2</sub> durante 24 h. Posteriormente se retiró el sobrenadante, añadiéndose medio nuevo con la dosis de antiinflamatorio correspondiente: 0.1, 1, 5, 10, 20, 100 y 1000  $\mu$ M de Dexketoprofeno, Ketorolaco, Metamizol y Aspirina. Como grupo control se incluyeron pocillos con medio de cultivo sin antiinflamatorio. A continuación se incubó durante 24 h y transcurrido dicho periodo de tiempo, las células se lavaron con medio (Sigma-Aldrich Co. Chem. Comp., St. Louis, Mo, USA). Se añadieron 100  $\mu$ l por pocillo de medio DMEM sin rojo fenol que contiene 5 mg/ml de MTT, incubándose durante cuatro horas a 37°C en estufa de CO<sub>2</sub> al 5%. Transcurrido ese tiempo, se retiró el sobrenadante y se añadieron 100  $\mu$ l por pocillo de Dimetilsulfóxido (DMSO), para disolver los cristales de formazan. Se dejó actuar durante 30 minutos y finalmente se midió por espectrofotometría, a una longitud de onda de 570 nm (SUNRISE™-Basic, TECAN, Männedorf, Switzerland).

### 3.1.2. Estudio del ciclo celular.

El efecto de los distintos AINEs ensayados sobre el ciclo celular de la línea MG63 se determinó mediante citometría de flujo según la técnica de Omerod, 2000. Se preparó una suspensión celular ( $1 \times 10^4$  células/ml) en medio DMEM suplementado con un 10% de SBF. Esta suspensión se dispuso en placas de 6 pocillos, de 5ml cada uno y se incubó durante 24 h en condiciones estándar de cultivo. Pasadas las 24h de incubación, se retiró el medio y las células adheridas fueron tratadas con los distintos AINEs. Para ello, se añadieron por pocillo 5 ml de medio DMEM conteniendo el AINE objeto de estudio a la dosis establecida (Dexketoprofeno, Ketorolaco y Metamizol: 1, 10, 100 y 1000  $\mu\text{M}$ ; Aspirina: 1, 10, 20, 100 y 1000  $\mu\text{M}$ ). Posteriormente, las células se incubaron en estufa de  $\text{CO}_2$  en las condiciones estándar de cultivo durante 24 h. Transcurrido ese tiempo de tratamiento se obtuvieron distintas suspensiones celulares (una para cada dosis, más una sin tratamiento utilizada como control) siguiendo la siguiente metodología: se descartó el medio de cultivo de cada pocillo, se lavó con una solución de tampón fosfato salino pH 7.4 (PBS) y las células adheridas a la superficie de la placa de cultivo se despegaron mediante tratamiento con 2 ml por pocillo de una solución de tripsina (0.05%) y EDTA (0.02%) a  $37^\circ\text{C}$  durante 10 minutos. A la suspensión celular obtenida se le añadió un volumen de 5 ml de medio de cultivo al 10% de SBF y se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos. Las células obtenidas se suspendieron en PBS (200 $\mu\text{l}$ ) y se fijaron con etanol frío al 70% (2 ml), incubándose durante 30 minutos en frío. Las células se lavaron por centrifugación y se suspendieron en 800  $\mu\text{l}$  de PBS. Con objeto de eliminar los posibles grumos las células fueron agitadas con jeringas de insulina. A continuación se trataron con 100  $\mu\text{l}$  de RNasa (1mg/ml) y se incubaron durante 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ , y se tiñeron con 100  $\mu\text{l}$  de Ioduro de Propidio (IP). Posteriormente las células fueron analizadas mediante citometría de flujo,

con un láser de Diodo de estado sólido a 488nm (FASC Canton II, SE Becton Dickinson, Palo Alto, California, USA).

### 3.1.3. Estudio de la inducción de apoptosis/necrosis.

El efecto de los AINES sobre la inducción de apoptosis fue determinada mediante la técnica de citometría de flujo previo marcaje con Anexina V e Ioduro de Propidio (IP) y mediante microscopía de fluorescencia previo marcaje con Hoechst/Ioduro de Propidio.

#### 3.1.3.1. Determinación de la inducción de apoptosis por citometría de flujo.

El efecto de los distintos AINEs sobre la inducción de apoptosis/necrosis en la línea celular MG63 se determinó mediante citometría de flujo previo marcaje con Anexina V e IP (ANNEXINVKIT, Immunostep, Salamanca, España).

Para ello se preparó una suspensión celular de  $1 \times 10^4$  células/ml, en medio DMEM suplementado con un 10% de SBF. Esta suspensión celular se dispuso en placas de cultivo de 6 pocillos, conteniendo cada uno de ellos un volumen de 5 ml y se incubaron durante 24 h en condiciones estándar de cultivo. Pasadas las 24 h de incubación, se retiró el medio y las células adheridas fueron tratadas. Para ello, se añadieron por pocillo 5 ml de medio DMEM conteniendo el AINE objeto de estudio a la dosis establecida (1, 10, 100 y 1000  $\mu\text{M}$  para Dexketoprofeno, Ketorolaco y Metamizol; y de 1, 10, 20, 100 y 1000  $\mu\text{M}$  para Aspirina) durante 12 h a 37°C en estufa de CO<sub>2</sub>. Transcurrido ese tiempo de tratamiento se obtuvieron distintas suspensiones celulares (una para cada dosis, más una sin tratamiento utilizada como control) siguiendo la siguiente metodología: se descartó el medio de cultivo de cada pocillo, se lavó con PBS y las células adheridas a la superficie de la placa de cultivo se despegaron mediante tratamiento con 2 ml por pocillo de una solución de

tripsina (0.05%) y EDTA (0.02%) a 37 °C durante 10 minutos. A la suspensión celular obtenida se le añadió un volumen de 5ml de medio de cultivo al 10% de SBF y se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos. El sedimento obtenido se suspendió en 500 µl de Buffer (Annexin V Binding Buffer, 1.0M Hepes/NaOH (pH 7.4), 1.4M NaCl, 25mM CaCl<sub>2</sub>) que fue distribuido en volúmenes de 100 µl a los que se les añadió 5 µl de Anexina V-FITC y 5 µl de IP. Posteriormente fueron incubadas durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Después del periodo de incubación se añadió 400 µl de Annexin-binding Buffer a cada tubo. A continuación las muestras fueron analizadas por citometría de flujo (FASC Canton II, SE Becton Dickinson, Palo Alto, California, USA). Los datos obtenidos fueron expresados como porcentaje de células en distintos cuadrantes:

Q1: porcentaje de células IP<sup>+</sup> (células necróticas)

Q2: porcentaje de células Annexina V<sup>+</sup> / IP<sup>+</sup> (células en apoptosis tardía)

Q3: porcentaje de células Annexina V<sup>-</sup> / IP<sup>-</sup> (células vivas)

Q4: porcentaje de células Annexina V<sup>+</sup> (células apoptóticas)

#### 3.1.3.2. Determinación de la inducción de apoptosis por microscopia de fluorescencia.

La determinación de la inducción apoptosis como consecuencia del tratamiento con los distintos AINEs se realizó por microscopía de fluorescencia mediante la técnica de doble marcaje con Hoechst /Ioduro de Propidio (HPI).

El Hoechst33342 es una pequeña molécula que puede penetrar en las membranas intactas tiñéndolas de azul. El IP, es una molécula más grande que sólo puede penetrar en las células cuando las membranas están dañadas, tiñendo de rojo el DNA de las células

muertas. Las células apoptóticas tiene la membrana intacta con lo que son teñidas de azul pero, sin embargo, debido al aglutinamiento de membrana que se produce estas células aparecen como pequeñas esferas azules.

Las células de la línea MG63 fueron cultivadas en placas de 24 pocillos ( $3 \times 10^4$  células/pocillo) durante 24 h; pasado este tiempo las células fueron tratadas con los diferentes AINEs (Dexketoprofeno, Ketorolaco, Metamizol, Aspirina) a dosis de  $10 \mu\text{M}$  durante 24 h. Tras dicho periodo de incubación, se retiró el sobrenadante, se lavaron las células con 1ml de PBS estéril y se le añadió  $10 \mu\text{l}$  de la solución colorante HPI. Dicha solución fue preparada mezclando  $20 \mu\text{l}$  de una solución Hoechst33342 ( $10 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ ),  $20 \mu\text{l}$  de IP ( $10 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ ) en  $460 \mu\text{l}$  de medio de cultivo. Las células fueron inmediatamente después analizadas bajo microscopía de fluorescencia (Inverted Axiovert 25 Zeiss), utilizando un filtro de banda ancha en una longitud de onda de excitación de 365 nm y una longitud de onda de emisión de 397 nm. El recuento de células se llevó a cabo en seis campos para cada muestra utilizando el objetivo 40X.

#### 3.1.4. Estudio de la citotoxicidad de los AINEs sobre la línea MG63.

El estudio de la citotoxicidad de los AINEs sobre la línea de osteosarcoma MG63 se llevó a cabo a través del análisis de la Lactato Deshidrogenasa (LDH). Para ello se cultivaron las células en placas de 24 pocillos ( $3 \times 10^4$  células/pocillo) durante 24 h y bajo condiciones de cultivo estándar. Posteriormente las células se trataron con Dexketoprofeno, Ketorolaco, Metamizol y Aspirina ( $1$  y  $10 \mu\text{M}$ ). Tras 24 h de incubación los sobrenadantes se recogieron y centrifugaron a  $500\text{g}$  durante 5 minutos. Finalmente fueron alicuotados y conservados a  $-70^\circ\text{C}$  hasta su procesamiento.

El análisis de la LDH se realizó utilizando el kit CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, Madison, USA). Siguiendo el protocolo del Kit utilizado, se dispensaron 50 µl del sobrenadante de cada muestra en placas de 96 pocillos, añadiéndose posteriormente 50 µl del sustrato por pocillos. Tras la incubación durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente, se añadieron 50 µl por pocillo de solución Stop, analizándose posteriormente por espectrofotometría (490 nm) (Biotek ELx800).

### 3.2. Efecto de los AINEs sobre la diferenciación celular de línea MG63.

Se ha estudiado el efecto del Metamizol, Ketorolaco, Aspirina y Dexketoprofeno sobre la diferenciación celular de la línea MG63 mediante la valoración de la capacidad de mineralización y el análisis de la síntesis de colágeno y fosfatasa alcalina.

#### 3.2.1. Estudio de la mineralización.

El efecto del tratamiento con Dexketoprofeno, Ketorolaco, Metamizol o Aspirina sobre el proceso de diferenciación del osteoblasto se determinó mediante la valoración de la formación de nódulos de calcio en la matriz extracelular, como consecuencia del cultivo de las células en medio osteogénico, según la metodología descrita por Bouvert-Gerbetaz y col. (2009).

El medio osteogénico se preparó a partir de medio de cultivo suplementado con un 10% de SBF, 5 mM de β-glicerolfosfato (Sigma-Aldrich Co. Chem. Comp., St. Louis, Mo, USA) y 0.05 mM de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich Co. Chem. Comp., St. Louis, Mo, USA).

El ensayo se realizó suspendiendo las células de la línea MG63 a una concentración final de  $5 \times 10^4$  células/ml bien en medio osteogénico (grupo control), o bien en medio



osteogénico complementado con las dosis de 1 y 10  $\mu\text{M}$  del AINE a estudiar (grupo tratado). Un volumen igual a 5 ml de las suspensiones celulares obtenidas en sus correspondientes medios de cultivo se dispuso en placas de cultivo de 6 pocillos, que posteriormente fueron incubadas a 37°C en atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5%. A los cuatro días de cultivo el medio fue remplazado por medio fresco de sus mismas características. A partir de ese momento los medios fueron reemplazados con una periodicidad de 3 días.

La lectura se realizó mediante tinción con Alizarina roja de las células adheridas al frasco de cultivo después de ser cultivadas en las condiciones anteriormente descritas durante 7, 15 y 20 días.

Trascurridos los tiempos de incubación correspondientes, las células fueron lavadas con cloruro de sodio 150 mM y fijadas con etanol frío al 70% durante 30 minutos. Tras ser enjuagadas en tres ocasiones con agua destilada, los pocillos se incubaron durante 10 minutos con 1 ml de solución de Alizarina roja 40 mM en  $\text{NaH}_2\text{P}_0_4$  a pH 4 y temperatura ambiente. Finalmente las muestras fueron lavadas 5 veces con agua destilada y se incubaron con PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente.

La lectura se realizó mediante microscopía óptica. Las muestras fueron observadas al microscopio (URA TECHNIC, Navarra, España) valorándose el número de nódulos por superficie analizada. Estos nódulos presentan un color rojo cristalino y se corresponden con la existencia de calcio precipitado en la matriz de colágeno extracelular. Las imágenes teñidas de los cultivos se capturaron con una cámara digital.

### 3.2.2. Estudio de la Síntesis de Fibras de Colágeno.

La síntesis de fibras de colágeno fue evaluada por medio de la técnica cualitativa Sirius Red F3BA. Para ello las células fueron cultivadas en placas de 24 pocillos con Dexketoprofeno, Ketorolaco y Metamizol (1 y 10  $\mu\text{M}$ ) y Aspirina (1, 10 y 20  $\mu\text{M}$ ), fueron ajustadas a una concentración de  $3 \times 10^4$  células/ml. Tras el periodo de incubación (24 h) y una vez retirado el sobrenadante, las células se lavaron con 1 ml de PBS y se fijaron con 200  $\mu\text{l}$  de formalina al 3.7% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron tres veces con 1 ml de PBS. Una vez que las células estaban fijadas se les añadió 500  $\mu\text{l}$  de la solución de tinción Sirius Red. Esta solución se preparó y filtró partiendo de 0.5 g de Sirius Red, 45 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ , 50 ml de Alcohol al 99%, 1 ml de  $\text{NaOH}_3$  al 1% y 2 gotas de  $\text{NaCl}$  al 20%. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante una hora. Transcurrido este periodo se retiró la solución de tinción y se lavó tres veces con 1 ml de PBS. Finalmente las muestras se analizaron bajo un microscopio óptico (Inverted NIKON Elipse TE2000U).

### 3.2.3. Estudio de la Actividad Fosfatasa Alcalina (AP).

Para el estudio del efecto de los distintos AINEs sobre la actividad Fosfatasa Alcalina de las células MG63, se partió de una concentración de  $3 \times 10^4$  células/ml que fue cultivada en placas de 24 pocillos durante 24 h, posteriormente se trataron con Dexketoprofeno, Ketorolaco y Metamizol (1 y 10  $\mu\text{M}$ ) y Aspirina (1, 10 y 20  $\mu\text{M}$ ). Tras 24 h de incubación se retiró el sobrenadante y se lisaron las células con Triton X-100 al 0.1%.

Después de observar por microscopía que las células estaban lisadas se añadió una solución buffer compuesta por 10 mM Tris-HCl pH 7.8, 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$  y Triton X-100 al 0.1 %, que detuvo la lisis. Este extracto celular se conservó a  $-70^\circ\text{C}$  hasta su procesamiento.

Para el análisis de la AP se utilizaron 50  $\mu\text{l}$  del extracto de células lisadas de cada muestra, que se dispensaron en placas de 96 pocillos, y se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de sustrato (P-nitrofenol fosfato) (Sigma Co. Chem. Comp., St. Louis, Mo, USA). Esta técnica mide la formación de un producto de color amarillo (4-Nitrofenol) como consecuencia de la acción catalítica de la AP sobre el sustrato.

Se incubó durante 45 minutos a 37°C; posteriormente se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de NaOH 0.1M para parar la reacción. Finalmente se midió la absorbancia con una longitud de onda de 405 nm.

Previamente se realizó una curva patrón con distintas concentraciones conocidas del producto (4-Nitrofenol), sobre la que extrapolar los datos de las muestras problema. Además se determinó la concentración de proteínas que contenían las muestras lisadas, al objeto de expresar la actividad ALP en  $\mu\text{M}/\text{minuto}/\text{mg}$  de proteínas. Dado que 1  $\mu\text{M}/\text{minuto}$  de producto equivale a 1 Unidad, la actividad AP finalmente se expresó en U/mg de proteínas.

### 3.3. Efecto de los AINEs sobre la adhesividad celular.

El estudio del efecto de los distintos AINEs sobre la capacidad de adhesión de la línea MG63 se realizó mediante una técnica espectrofotométrica.

Las células suspendidas en medio de cultivo que contenían SBF al 10% y distintas dosis de Dexketoprofeno, Ketorolaco y Metamizol (1 y 10  $\mu\text{M}$ ) y Aspirina (1, 10 y 20  $\mu\text{M}$ ) fueron ajustadas a una concentración de  $1 \times 10^4$  células/ml y se dispusieron en placas de cultivo de 96 pocillos.

Las células adheridas a las placas de cultivo se determinaron a distintos tiempos de incubación: 30, 60, 90, 120 y 180 minutos. Transcurridos los diferentes periodos de tiempo establecidos, se retiró el sobrenadante y se añadieron 100µl por pocillo de medio DMEM sin rojo fenol que contenía 5 mg/ml de MTT, incubándose durante cuatro horas a 37°C en estufa de CO<sub>2</sub> al 5%. A continuación se retiró el sobrenadante y se añadieron 100 µl por pocillo de DMSO. Se incubó durante 30 minutos y se midió por espectrofotometría (570nm).

#### 3.4. Efecto de los AINEs sobre el perfil antigénico.

Para estudiar el efecto de los diferentes AINEs seleccionados sobre la expresión antigénica de la línea celular MG63 se preparó una suspensión celular de  $1 \times 10^4$  células/ml, en medio DMEM suplementado con un 10% de SBF. Esta suspensión celular se dispuso en placas de cultivo de 6 pocillos, conteniendo cada uno de ellos un volumen de 5 ml y se incubaron durante 24 h en condiciones estándar de cultivo. Pasadas las 24 h de incubación, se retiró el medio y las células adheridas fueron tratadas. Para ello, se añadieron por pocillo 5 ml de medio DMEM conteniendo el AINE objeto de estudio a la dosis establecida: 1 y 10 µM para Dexketoprofeno, Ketorolaco y Metamizol; y 1, 10 y 20 µM para la Aspirina, durante 24 h a 37°C en estufa de CO<sub>2</sub>. Transcurrido ese tiempo de tratamiento se obtuvieron distintas suspensiones celulares (una para cada dosis, más una sin tratamiento utilizada como control) mediante el siguiente método: se descartó el medio de cultivo de cada pocillo, se lavó con PBS y las células adheridas a la superficie de la placa de cultivo se despegaron mediante tratamiento con 2 ml por pocillo de una solución de tripsina (0.05%) y EDTA (0.02%) a 37 °C durante 10 minutos y se neutralizó con 5 ml de medio de cultivo al 10% de SBF. Posteriormente se lavaron por centrifugación durante 10 minutos a

1200 rpm. El sedimento obtenido se suspendió en 600  $\mu$ l de medio DMEM sin rojo fenol al 10% de SBF. 100  $\mu$ l de esta suspensión celular se incubaron con 5  $\mu$ l de Abmo correspondiente (ver tabla 2) durante 30 minutos en oscuridad. Transcurrido este periodo las células fueron lavadas por centrifugación con 1 ml de PBS y el sedimento se suspendió en 800 $\mu$ l de PBS para su lectura en un citómetro de flujo (FASC Canton II, SE Becton Dickinson, Palo Alto, California, USA).

En todos los ensayos se incluyeron controles de isotipo con objeto de descartar los falsos positivos por unión inespecífica.

**Tabla2. Anticuerpos monoclonales utilizados en el estudio del efecto de los AINEs sobre el perfil antigénico en la línea celular MG63.**

Abmo	CD/ especificidad	Fluorocromo	Casa comercial
CONTROL	-	FITC	Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA.
CD 54/IOL1b	CD 54	FITC	Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA.
CD 80	CD 80	FITC	Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA.
CD 86	CD 86	FITC	Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA.
OKDR	HLA-DR	FITC	Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA.

### 3.5. Efecto de los AINEs sobre capacidad fagocítica.

Para el estudio del efecto de los diferentes AINEs seleccionados sobre la capacidad fagocítica de la línea celular MG63 se preparó una suspensión celular de  $1 \times 10^4$  células/ml, en medio DMEM suplementado con un 10% de SBF. Esta suspensión celular se dispuso en placas de cultivo de 6 pocillos, conteniendo cada uno de ellos un volumen de 5 ml y se incubaron durante 24 h en condiciones estándar de cultivo. Pasadas las 24 h de incubación, se retiró el medio y las células adheridas fueron tratadas. Para ello, se añadieron por pocillo 5 ml de medio DMEM conteniendo el AINE objeto de estudio a la dosis establecida: 1 y 10  $\mu\text{M}$  para Dexketoprofeno, Ketorolaco y Metamizol; y 1, 10 y 20  $\mu\text{M}$  para la Aspirina, durante 24 h a 37°C en estufa de CO<sub>2</sub>. Transcurrido ese tiempo de tratamiento se obtuvieron distintas suspensiones celulares (una para cada dosis, más una sin tratamiento utilizada como control) siguiendo la siguiente metodología: se descartó el medio de cultivo de cada pocillo, se lavó con PBS y las células adheridas a la superficie de la placa de cultivo se despegaron mediante tratamiento con 2 ml por pocillo de una solución de tripsina (0.05%) y EDTA (0.02%) a 37 °C durante 10 minutos y se neutralizó con 5 ml de medio de cultivo al 10% de SBF. Posteriormente se lavaron por centrifugación durante 10 minutos a 1200 rpm. El sedimento obtenido se suspendió en 600  $\mu\text{l}$  de medio DMEM sin rojo fenol al 10% de SBF, 100  $\mu\text{l}$  de esta suspensión celular se incubaron con 10  $\mu\text{l}$  de una suspensión de bolitas de látex (Sigma Chem. Comp., St. Louis, Mo, USA) diluida 1:10 en PBS a 37°C durante 30 minutos en oscuridad. Las bolitas de látex poseen 2  $\mu\text{m}$  de diámetro y están marcadas con fluoresceína. Finalmente las células se lavaron por centrifugación con 1ml de medio y el sedimento obtenido se suspendió en 800  $\mu\text{l}$  de PBS para su posterior lectura en un citómetro de flujo. Los resultados obtenidos se expresaron como el porcentaje de células que han fagocitado partículas de látex y por tanto se muestran fluorescentes.

#### 4. Análisis estadístico

Todas las experiencias realizadas para la consecución de los objetivos de esta Tesis Doctoral se realizaron al menos tres veces.

Los datos se analizaron con el software R (version 2.9.2 Auckland, New Zealand). Se calcularon para cada variable los valores de la media ( $\pm$  desviación estándar) y el intervalo de confianza para la media (IC 95%). El Test de Kolmogorov-Smirnov demostró una distribución normal de los datos ( $P > 0.05$ ). Para examinar el efecto de la intervención sobre la proliferación, diferenciación y adhesividad celular, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA), considerando como variables tratamientos (Aspirina, Dexketoprofeno, Ketorolaco, Metamizol), tiempo de tratamiento y concentraciones. Cuando se identificó una interacción significativa, se aplicó el Test de Bonferroni. El perfil antigénico y fagocítico, el ciclo celular y la apoptosis se compararon usando el test de la  $t$  de Student. Un valor de  $P$  inferior a 0.05 se consideró estadísticamente significativo en todos los tests.

## **RESULTADOS**



## Efecto de los AINEs sobre la línea celular MG63

### 1. Efecto de los AINEs sobre el crecimiento celular.

El efecto de los AINEs sobre el crecimiento celular de la línea MG63 se estudió mediante distintas técnicas que nos aportan información complementaria respecto a este parámetro celular. En todos los casos las células se trataron con diferentes dosis de AINEs durante 24 h para su posterior estudio.

#### 1.1. Estudio de la proliferación celular.

El tratamiento de la línea celular MG63, con las dosis de 0.1, 1, 5, 10, 20, 100 y 1000  $\mu\text{M}$  de Dexketoprofeno durante 24 h, produce una inhibición significativa de la proliferación celular con respecto al grupo control (células no tratadas) con valores de  $P < 0.001$  (Fig.3 y tabla 3).

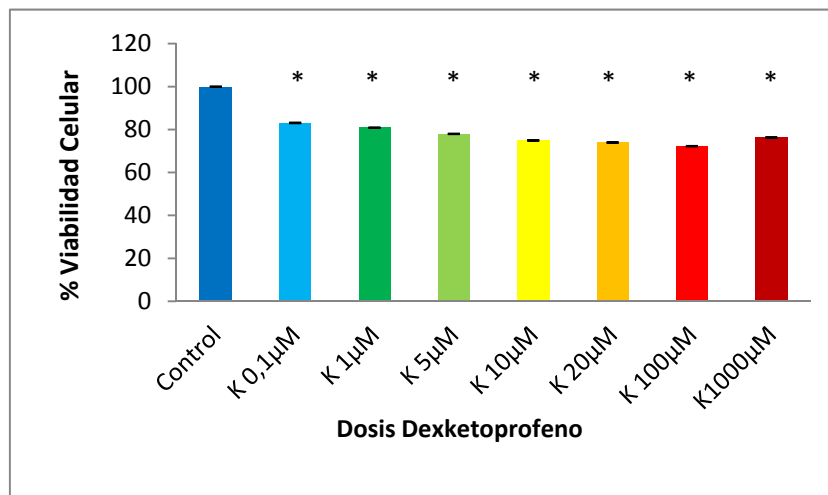


Figura 3. Porcentaje de viabilidad celular, determinada mediante el método del MTT, de la línea MG63 tratada durante 24 h con diferentes dosis de Dexketoprofeno (0.1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  y 1000  $\mu\text{M}$ ). \* $p < 0.001$

**Tabla 3. Efecto del Dexketoprofeno sobre la viabilidad celular de la línea celular MG63 tras 24 h de tratamiento.**

Tratamiento	Viabilidad celular (valor medio de la DO <sup>a</sup> )	SD <sup>b</sup>	Valor P	I.C. (95%) <sup>c</sup>
Control	2,766	0,1244	-	-
Dexketoprofeno 0,1 μM	2,299	0,1754	0,000*	0,3592 ; 0,5749
Dexketoprofeno 1 μM	2,239	0,0913	0,000*	0,4639 ; 0,5910
Dexketoprofeno 5 μM	2,158	0,1099	0,000*	0,5396 ; 0,6760
Dexketoprofeno 10 μM	2,074	0,1892	0,000*	0,5973 ; 0,7874
Dexketoprofeno 20 μM	2,047	0,1837	0,000*	0,5723 ; 0,8668
Dexketoprofeno 100 μM	2,000	0,1028	0,000*	0,2493 ; 0,3838
Dexketoprofeno 1000 μM	2,112	0,1219	0,000*	0,5829 ; 0,7261

<sup>a</sup> Densidad óptica, <sup>b</sup> Desviación estándar, <sup>c</sup> Intervalo de confianza; \* Diferencias Significativas.

De igual modo, como podemos observar en la Fig. 4 y tabla 4, el tratamiento con Ketorolaco, a las mismas dosis, produjo una inhibición del crecimiento de los osteoblastos ( $P < 0.001$ ), la cual fue dosis dependiente.

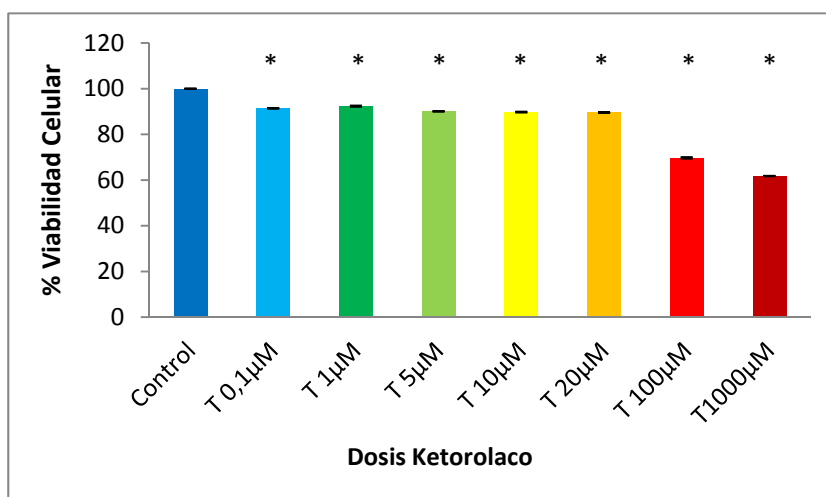


Figura 4. Porcentaje de viabilidad celular, determinada mediante el método del MTT, de la línea MG63 tratada durante 24 h con diferentes dosis de Ketorolaco (0.1 μM, 1 μM, 10 μM, 20 μM, 100 μM y 1000 μM). \* $p < 0.001$

**Tabla 4. Efecto del Ketorolaco sobre la viabilidad celular de la línea celular MG63 tras 24 h de tratamiento.**

Tratamiento	Viabilidad celular (valor medio de la DO <sup>a</sup> )	SD <sup>b</sup>	Valor P	I.C. (95%) <sup>c</sup>
Control	2,533	0,1109	-	-
Ketorolaco 0,1 $\mu$ M	2,315	0,1355	<b>0,000*</b>	<b>0,1448 ; 0,2907</b>
Ketorolaco 1 $\mu$ M	2,339	0,2505	<b>0,002*</b>	<b>0,0775 ; 0,3106</b>
Ketorolaco 5 $\mu$ M	2,281	0,1542	<b>0,000*</b>	<b>0,1720 ; 0,3305</b>
Ketorolaco 10 $\mu$ M	2,273	0,1731	<b>0,000*</b>	<b>0,1745 ; 0,3454</b>
Ketorolaco 20 $\mu$ M	2,269	0,0612	<b>0,000*</b>	<b>0,2024 ; 0,3259</b>
Ketorolaco 100 $\mu$ M	1,765	0,3213	<b>0,000*</b>	<b>0,6252 ; 0,9099</b>
Ketorolaco 1000 $\mu$ M	<b>1,564</b>	<b>0,0604</b>	<b>0,000*</b>	<b>0,9151 ; 1,0217</b>

<sup>a</sup> Densidad óptica, <sup>b</sup> Desviación estándar, <sup>c</sup> Intervalo de confianza; \* Diferencias Significativas.

Sin embargo, cuando las células fueron tratadas con Metamizol (Fig. 5, tabla 5) no observamos diferencias significativas a dosis de 0.1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M y 5  $\mu$ M. Fue a partir de la dosis 10  $\mu$ M, cuando detectamos un efecto inhibitorio significativo sobre la proliferación de la línea celular, con valores de  $P < 0.001$  (10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M y 1000  $\mu$ M) y  $P = 0.02$  (100 $\mu$ M).

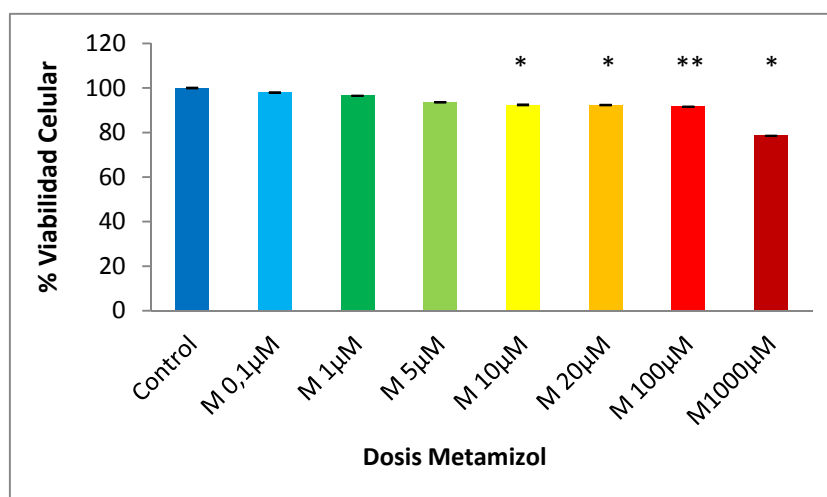


Figura 5. Porcentaje de viabilidad celular, determinada mediante el método del MTT, de la línea MG63 tratada durante 24 h con diferentes dosis de Metamizol (0.1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 100  $\mu$ M y 1000  $\mu$ M). \* $p < 0.001$ ; \*\* $p = 0.02$

**Tabla 5. Efecto del Metamizol sobre la viabilidad celular de la línea celular MG63 tras 24 h de tratamiento.**

Tratamiento	Viabilidad celular (valor medio de la DO <sup>a</sup> )	SD <sup>b</sup>	Valor P	I.C. (95%) <sup>c</sup>
Control	2,697	0,1779	-	-
Metamizol 0,1 µM	2,641	0,0532	0,599	-0,1602 ; 0,2719
Metamizol 1 µM	2,603	0,0067	0,377	-0,1212 ; 0,3093
Metamizol 5 µM	2,524	0,0596	0,113	-0,0435 ; 0,3890
Metamizol 10 µM	2,493	0,2281	<b>0,001*</b>	<b>0,8533 ; 0,3234</b>
Metamizol 20 µM	2,490	0,1515	<b>0,000*</b>	<b>0,1106 ; 0,3027</b>
Metamizol 100 µM	2,470	0,0836	<b>0,02*</b>	<b>0,3876 ; 0,4156</b>
Metamizol 1000 µM	<b>2,118</b>	<b>0,0773</b>	<b>0,000*</b>	<b>0,4989 ; 0,6584</b>

<sup>a</sup> Densidad óptica, <sup>b</sup> Desviación estándar, <sup>c</sup> Intervalo de confianza; \* Diferencias Significativas.

En la Fig. 6 y tabla 6 se muestran los resultados obtenidos con la Aspirina, en este caso se puede observar que a dosis bajas (0.1 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM y 20 µM), este AINE no ejerce ningún efecto sobre la proliferación la línea MG63 después de las 24 h de cultivo; mientras que la Aspirina a altas dosis (100 µM y 1000 µM) si mostró un efecto inhibitorio significativo en relación con el control, con valores de  $P=0.01$  y  $P<0.001$  respectivamente.

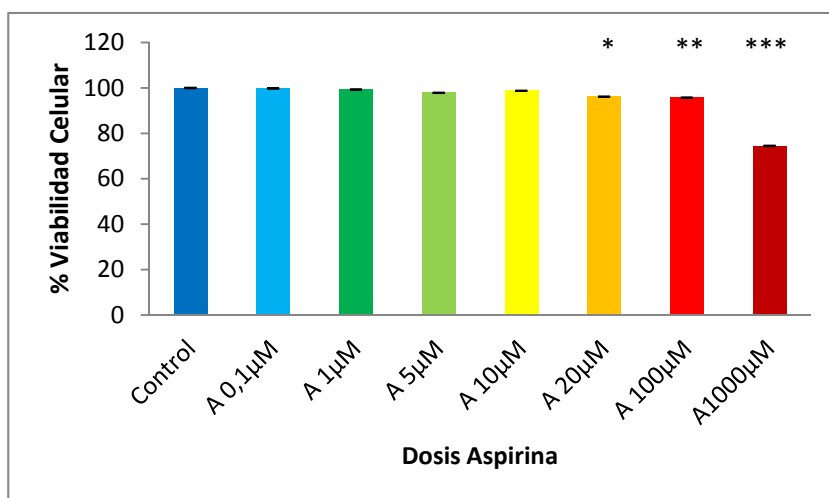


Figura 6. Porcentaje de viabilidad celular, determinada mediante el método del MTT, de la línea MG63 tratada durante 24 h con diferentes dosis de Aspirina (0.1 µM, 1 µM, 10 µM, 20 µM, 100 µM y 1000 µM). \* $p=0.037$ ; \*\* $p=0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$

**Tabla 6. Efecto del Metamizol sobre la viabilidad celular de la línea celular MG63 tras 24 h de tratamiento.**

Tratamiento	Viabilidad celular (valor medio de la DO <sup>a</sup> )	SD <sup>b</sup>	Valor P	I.C. (95%) <sup>c</sup>
Control	2,329	0,1026		
Aspirina 0,1 $\mu$ M	2,324	0,1584	0,920	<b>-0,0916 ; 0,1011</b>
Aspirina 1 $\mu$ M	2,312	0,0786	0,655	<b>-0,0571 ; 0,0893</b>
Aspirina 5 $\mu$ M	2,279	0,0710	0,200	<b>-0,0286 ; 0,1283</b>
Aspirina 10 $\mu$ M	2,300	0,0405	0,516	<b>-0,0922 , 0,0489</b>
Aspirina 20 $\mu$ M	2,239	0,1047	<b>0,037*</b>	<b>0,0056 ; 0,1733</b>
Aspirina 100 $\mu$ M	2,229	0,0226	<b>0,01*</b>	<b>0,0293 ; 0,1690</b>
Aspirina 1000 $\mu$ M	<b>1,734</b>	<b>0,1088</b>	<b>0,000*</b>	<b>0,5150 , 0,6735</b>

<sup>a</sup> Densidad óptica, <sup>b</sup> Desviación estándar; <sup>c</sup> Intervalo de confianza; \* Diferencias Significativas.

## 1.2. Estudio del ciclo celular.

En relación con el ciclo celular, nuestros resultados muestran que el tratamiento con Dexketoprofeno a dosis 1  $\mu$ M no produjo cambio alguno en las distintas fases del ciclo de la línea MG63 en cultivo. En cambio, sí que se detectó una disminución en el porcentaje de células en las fases G2-M y S al ser tratadas con las dosis 10, 100 y 1000  $\mu$ M; lo que supuso un aumento significativo del porcentaje de células en la fase G0-G1, con un valor de  $P= 0.0001$  para las tres dosis estudiadas (Fig. 7 y tabla 7).

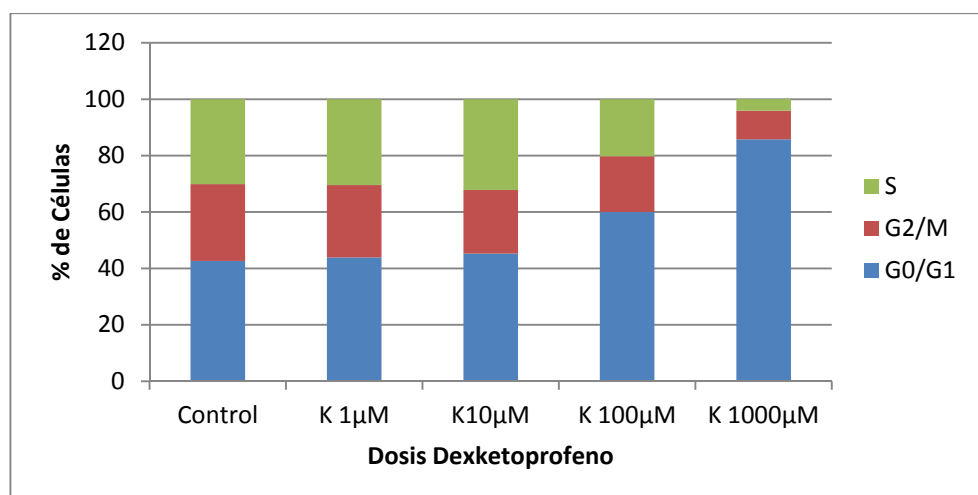


Figura 7. Efecto del Dexketoprofeno sobre el ciclo celular de la línea MG63 determinado por citometría de flujo. El cultivo celular fue tratado con la dosis de 1, 10, 100 y 1000 µM de Dexketoprofeno, durante 24 h. El grupo control se cultivó bajo las mismas condiciones sin tratamiento. G0/G1, G2/M y S representan el porcentaje de células distribuidas en dicha fase después del tratamiento.

**Tabla 7. Porcentaje de células en las fases G0-G1, G2-M y S del Ciclo celular de la línea celular MG63 tratada durante 24h con Dexketoprofeno a la dosis de 1, 10, 100 y 1000 µM.**

Tratamiento	% de Células en fase G0-G1		% de Células en fase G2-M		% de Células en fase S	
	Media	Valor p	Media	Valor p	Media	Valor p
<b>Control</b>	42,68 (0,1)	-	27,22 (0,57)	-	30,09(0,53)	-
<b>Dexketoprofeno 1 µM</b>	43,94(1,45)	0,2	25,61 (1,02)	0,07	30,44(0,52)	0,46
<b>Dexketoprofeno 10 µM</b>	45,28(0,36)	<b>0,0001*</b>	22,53 (1,02)	<b>0,002*</b>	32,18(1,35)	0,069
<b>Dexketoprofeno 100 µM</b>	60,03(0,32)	<b>0,0001*</b>	19,72 (0,37)	<b>0,0001*</b>	20,24(0,25)	<b>0,0001*</b>
<b>Dexketoprofeno 1000 µM</b>	85,77(1,21)	<b>0,0001*</b>	10,15 (1,02)	<b>0,0001*</b>	4,09(0,24)	<b>0,0001*</b>

\* Diferencias Significativas

El tratamiento con distintas dosis de Ketorolaco (1, 10, 100 y 1000 µM) produjo cambio significativos en el perfil de fluorescencia de las distintas fases del ciclo celular de la línea osteoblástica MG63, comparándolos con el grupo control, el cual no recibió ningún tipo de tratamiento, sólo el porcentaje de células en fase G0-G1 para la dosis 1 µM no mostró cambio significativo (Fig. 8 y tabla 8).

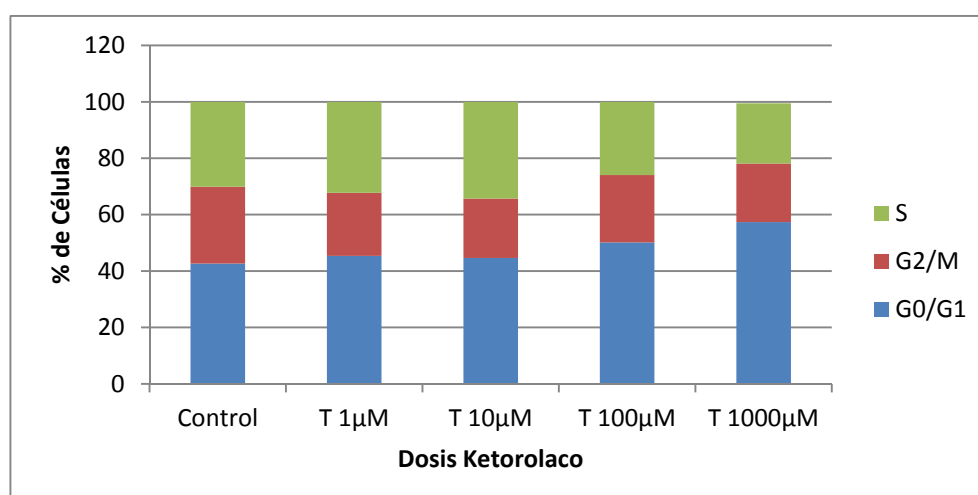


Figura 8. Efecto del Ketorolaco sobre el ciclo celular de la línea MG63 determinado por citometría de flujo. El cultivo celular fue tratado con la dosis de 1, 10, 100 y 1000  $\mu\text{M}$  de Ketorolaco, durante 24h. El grupo control se cultivó bajo las mismas condiciones sin tratamiento. G0/G1, G2/M y S representan el porcentaje de células distribuidas en dicha fase después del tratamiento.

**Tabla 8. Porcentaje de células en las fases G0-G1, G2-M y S del Ciclo celular de la línea celular MG63 tratada durante 24 h con Ketorolaco a la dosis de 1, 10, 100 y 1000  $\mu\text{M}$ .**

Tratamiento	% de Células en fase G0-G1		% de Células en fase G2-M		% de Células en fase S	
	Media	Valor p	Media	Valor p	Media	Valor p
Control	42,68 (0,10)	-	27,22 (0,58)	-	30,09 (0,53)	-
Ketorolaco 1 $\mu\text{M}$	44,64 (2,06)	0,24	21,04 (2,97)	<b>0,02*</b>	34,31 (1,18)	<b>0,005*</b>
Ketorolaco 10 $\mu\text{M}$	45,36 (0,27)	<b>0,0001*</b>	22,37 (0,54)	<b>0,0001*</b>	32,26 (0,42)	<b>0,005*</b>
Ketorolaco 100 $\mu\text{M}$	50,13 (0,36)	<b>0,0001*</b>	23,89 (0,8)	<b>0,004*</b>	25,97 (1,02)	<b>0,003*</b>
Ketorolaco 1000 $\mu\text{M}$	57,34 (0,60)	<b>0,0001*</b>	20,77 (1,22)	<b>0,001*</b>	21,34 (1,76)	<b>0,002*</b>

\* Diferencias Significativas

En la Fig. 9 y tabla 9 se muestra el porcentaje de células distribuidas en las distintas fases del ciclo celular de la línea de osteosarcoma MG63 tratada con Metamizol. Como se puede comprobar dicho antiinflamatorio no produce cambios significativos en la distribución de las células en las diferentes fases, con respecto del grupo control.

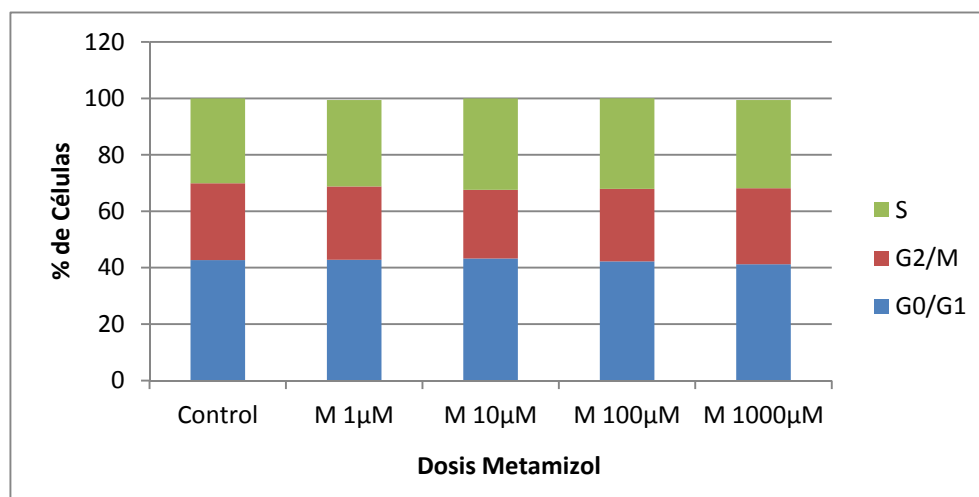


Figura 9. Efecto del Metamizol sobre el ciclo celular de la línea MG63 determinado por citometría de flujo. El cultivo celular fue tratado con la dosis de 1, 10, 100 y 1000 µM de Metamizol, durante 24 h. El grupo control se cultivó bajo las mismas condiciones sin tratamiento. G0/G1, G2/M y S representan el porcentaje de células distribuidas en dicha fase después del tratamiento.

**Tabla 9. Porcentaje de células en las fases G0-G1, G2-M y S del Ciclo celular de la línea celular MG63 tratada durante 24 h con Metamizol a la dosis de 1, 10, 100 y 1000 µM.**

Tratamiento	% de Células en fase G0-G1		% de Células en fase G2-M		% de Células en fase S	
	Media	Valor p	Media	Valor p	Media	Valor p
<b>Control</b>	42,68 (0,10)	-	27,22 (0,58)	-	30,09 (0,53)	-
<b>Metamizol 1 µM</b>	42,79 (0,88)	0,84	26,01 (1,03)	1,13	30,60 (1,30)	0,56
<b>Metamizol 10 µM</b>	43,24 (0,86)	0,37	24,33 (2,21)	0,14	32,42 (1,35)	0,051
<b>Metamizol 100 µM</b>	42,68 (1,74)	1	25,71 (0,92)	0,57	32,11 (1,94)	0,149
<b>Metamizol 1000 µM</b>	41,21 (1,06)	0,69	26,93 (0,69)	0,587	31,28 (0,70)	0,62



En la Fig.10 y tabla 10 se muestran los resultados obtenidos tras el tratamiento con Aspirina sobre el ciclo celular de la línea MG63. El tratamiento con la dosis de 1, 10 y 20  $\mu\text{M}$ , no produjo cambios en el ciclo celular de la línea MG63, ya que no se observaron cambios significativos en el porcentaje de células distribuidas en las distintas fases. Sin embargo, en el tratamiento con la dosis 100 y 1000  $\mu\text{M}$  sí se observaron cambios a nivel del ciclo celular, con un aumento significativo del porcentaje de células en fase G0-G1 ( $P=0.006$  y  $P=0.0001$ ), y una disminución del porcentaje de células en fase G2-M y S.

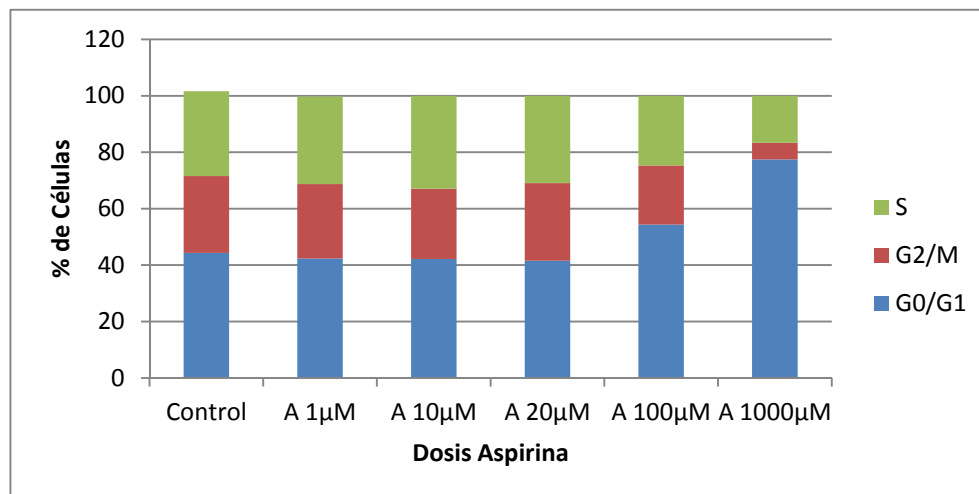


Figura 10. Efecto de la Aspirina sobre el ciclo celular de la línea MG63 determinado por citometría de flujo. El cultivo celular fue tratado con la dosis de 1, 10, 100 y 1000  $\mu\text{M}$  de Aspirina, durante 24 h. El grupo control se cultivó bajo las mismas condiciones sin tratamiento. G0/G1, G2/M y S representan el porcentaje de células distribuidas en dicha fase después del tratamiento.

**Tabla 10. Porcentaje de células en las fases G0-G1, G2-M y S del Ciclo celular de la línea celular MG63 tratada durante 24 h con Aspirina a la dosis de 1, 10, 100 y 1000 µM.**

Tratamiento	% de Células en fase G0-G1		% de Células en fase G2-M		% de Células en fase S	
	Media	Valor p	Media	Valor p	Media	Valor p
<b>Control</b>	44,34 (2,79)	-	27,22 (0,57)	-	30,09 (0,07)	-
<b>Aspirina 1 µM</b>	42,34 (2,63)	0,46	26,41 (2,26)	0,58	31,02 (0,41)	0,07
<b>Aspirina 10 µM</b>	42,21 (5,25)	0,5	24,85 (3,74)	0,3	32,94 (2,48)	0,1
<b>Aspirina 20 µM</b>	41,54 (2,16)	0,24	27,52 (0,60)	0,57	30,93 (1,75)	0,47
<b>Aspirina 100 µM</b>	54,38 (1,79)	<b>0,006*</b>	20,94 (1,35)	<b>0,002*</b>	24,68 (2,96)	<b>0,03*</b>
<b>Aspirina 1000 µM</b>	77,44 (0,83)	<b>0,0001*</b>	5,95 (1,15)	<b>0,0001*</b>	16,60 (1,93)	<b>0,0001*</b>

\* Diferencias Significativas

### 1.3. Efecto de los AINEs sobre la inducción de apoptosis.

La inducción de apoptosis como consecuencia del tratamiento con los AINEs ha sido estudiada mediante citometría de flujo y mediante microscopía de fluorescencia.

#### 1.3.1. Determinación de la inducción de apoptosis por citometría de flujo.

El análisis de los resultados obtenidos en el estudio de la inducción de apoptosis/necrosis como consecuencia del tratamiento de la línea MG63 durante 12 h con Dexketoprofeno muestra un aumento significativo del porcentaje de células en apoptosis a partir de la dosis de 10 µM (Fig. 11 y tabla 11). Así mismo, podemos observar, que a medida que aumenta la dosis, aumenta tanto el porcentaje de células en apoptosis (apoptosis temprana y apoptosis tardía) como el porcentaje de células necróticas, disminuyendo en consecuencia de manera significativa el porcentaje de células vivas.

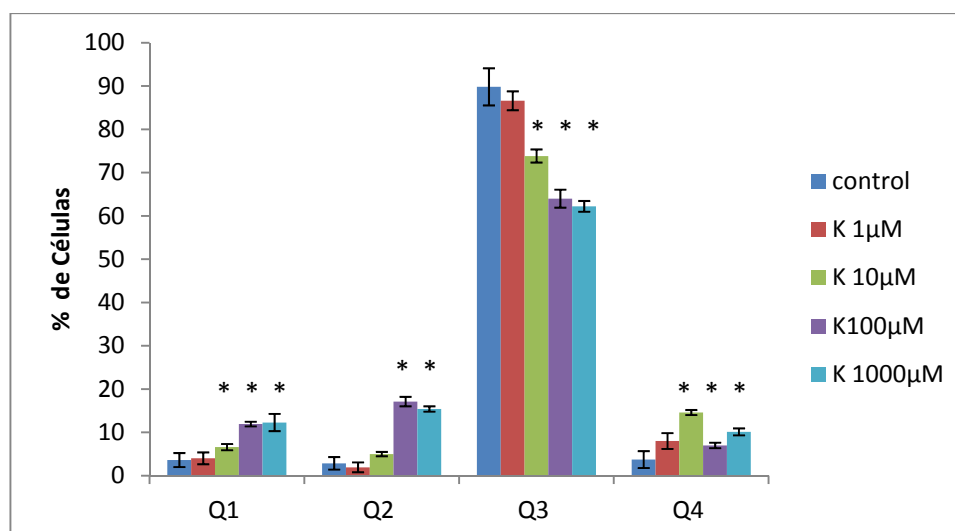


Figura 11. Estudio mediante citometría de flujo de la inducción de apoptosis mediante doble marcaje con Annexina V e IP. Expresado como el porcentaje de células marcadas con Annexina V e IP después de su tratamiento durante 12 h con Dexketoprofeno a la dosis de 1, 10, 100 y 1000  $\mu$ M. Q1 (necrosis:Ann V<sup>-</sup>, IP<sup>+</sup>), Q2 (apoptosis tardía: Ann V<sup>+</sup>, IP<sup>+</sup>), Q3 (Negativo: Ann V<sup>-</sup>, IP<sup>-</sup>), Q4 (apoptosis: Ann V<sup>+</sup>, IP<sup>-</sup>). \* p<0.05.

**Tabla 11. Porcentaje de células marcadas con Annexina V y/o IP analizadas mediante citometría de flujo después de su tratamiento durante 12 h con Dexketoprofeno.**

Tratamiento		% de células (valor medio)	SD <sup>a</sup>	VALOR P	I.C. (95%) <sup>b</sup>
Control	Q1 Necrosis	3,61	1,6163	-	-
	Q2 Ap. Tardía	2,84	1,4530	-	-
	Q3 Negativo	89,82	4,2866	-	-
	Q4 Apoptosis	3,71	1,9480	-	-
Dexketoprofeno 1 $\mu$ M	Q1 Necrosis	4,00	0,8821	0,700	-2,7975 ; 2,0308
	Q2 Ap. Tardía	1,92	1,1287	0,385	-1,5686 , 3,4120
	Q3 Negativo	86,60	5,4121	0,370	-6,0459 ; 13,5576
	Q4 Apoptosis	8,00	3,4302	0,113	-10,0476 ; 1,4526
Dexketoprofeno 10 $\mu$ M	Q1 Necrosis	6,59	0,7245	<b>0,044*</b>	-5,8193 ; -0,1406
	Q2 Ap. Tardía	4,98	0,5058	0,074	-4,6063 ; 0,3263
	Q3 Negativo	73,84	1,5153	<b>0,004*</b>	8,6952 ; 23,2714
	Q4 Apoptosis	14,58	0,5868	<b>0,001*</b>	-14,0965 ; -7,6434
Dexketoprofeno 100 $\mu$ M	Q1 Necrosis	11,91	0,5335	<b>0,001*</b>	-11,0218 ; -5,5648
	Q2 Ap. Tardía	17,11	1,0900	<b>0,000*</b>	-17,1784 ; -11,3549
	Q3 Negativo	63,99	2,0800	<b>0,001*</b>	18,1890 ; 33,4642
	Q4 Apoptosis	6,97	0,6206	<b>0,050*</b>	-6,5439 ; 0,0106
Dexketoprofeno 1000 $\mu$ M	Q1 Necrosis	12,27	1,9884	<b>0,004*</b>	-12,7642 ; -4,5490
	Q2 Ap. Tardía	15,40	0,6182	<b>0,000*</b>	-15,0879 ; -10,0253
	Q3 Negativo	62,21	1,2459	<b>0,000*</b>	20,4575 ; 34,7690
	Q4 Apoptosis	10,11	0,7966	<b>0,006*</b>	-9,7769 ; -3,0297

<sup>a</sup> Desviación Estándar; <sup>b</sup> Intervalo de Confianza; \* Diferencias significativas.

Con respecto al tratamiento con Ketorolaco, como se muestra en la Fig. 12 y tabla 12, éste se tradujo en un aumento significativo del porcentaje de células en apoptosis a la dosis 1  $\mu\text{M}$ , no detectándose cambios significativos en el número de células necróticas o en el número de células en apoptosis tardía. Mientras que a la dosis de 10, 100 y 1000  $\mu\text{M}$  se incrementó significativamente tanto el porcentaje de células apoptóticas, (apoptóticas tempranas y apoptóticas tardías), como el de células necróticas.

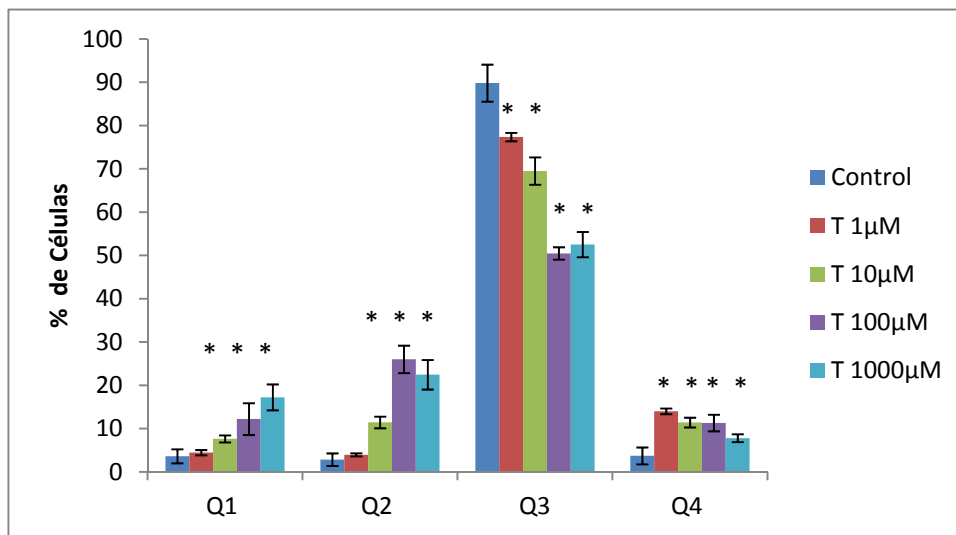


Figura 12. Estudio mediante citometría de flujo de la inducción de apoptosis mediante doble marcaje con Annexina V e IP. Expresado como el porcentaje de células marcadas con Annexina V e IP después de su tratamiento durante 12 h con Ketorolaco a la dosis de 1, 10, 100 y 1000  $\mu\text{M}$ . Q1 (necrosis: Ann V<sup>-</sup>, IP<sup>+</sup>), Q2 (apoptosis tardía: Ann V<sup>+</sup>, IP<sup>+</sup>), Q3 (Negativo: Ann V<sup>-</sup>, IP<sup>-</sup>), Q4 (apoptosis: Ann V<sup>+</sup>, IP<sup>-</sup>). \*p<0.05.

**Tabla 12. Porcentaje de células marcadas con Annexina V y/o IP analizadas mediante citometría de flujo después de su tratamiento durante 12 h con Ketorolaco.**

<i>Tratamiento</i>		<i>% de Células (Valor medio)</i>	<i>SD<sup>a</sup></i>	<i>VALOR P</i>	<i>I,C, (95%)<sup>b</sup></i>
<b>Control</b>	<b>Q1</b> Necrosis	3,61	1,6163	-	-
	<b>Q2</b> Ap. Tardía	2,84	1,4530	-	-
	<b>Q3</b> Negativo	89,82	4,2866	-	-
	<b>Q4</b> Apoptosis	3,71	1,9480	-	-
<b>Ketorolaco 1 µM</b>	<b>Q1</b> Necrosis	4,45	0,6139	0,451	-3,6049 ; 1,9382
	<b>Q2</b> Ap. Tardía	3,95	0,3493	0,317	-4,4748 ; 2,2614
	<b>Q3</b> Negativo	77,36	0,9750	<b>0,032*</b>	2,4656 ; 22,4610
	<b>Q4</b> Apoptosis	14,00	0,6633	<b>0,001*</b>	-13,5902 ; -6,9946
<b>Ketorolaco 10 µM</b>	<b>Q1</b> Necrosis	7,64	0,8143	<b>0,018*</b>	-6,9245 ; -1,1221
	<b>Q2</b> Ap. Tardía	11,43	1,3439	<b>0,002*</b>	-11,7560 ; -5,4105
	<b>Q3</b> Negativo	69,51	3,1578	<b>0,003*</b>	11,7720 ; 28,8412
	<b>Q4</b> Apoptosis	11,41	1,1285	<b>0,004*</b>	-11,3121 ; -4,0945
<b>Ketorolaco 100 µM</b>	<b>Q1</b> Necrosis	12,21	3,6766	<b>0,021*</b>	-15,0312 ; -2,1553
	<b>Q2</b> Ap. Tardía	26,00	3,1773	<b>0,000*</b>	-28,7605 ; -17,5594
	<b>Q3</b> Negativo	50,47	1,4314	<b>0,000*</b>	32,1022 ; 46,5910
	<b>Q4</b> Apoptosis	11,31	1,9125	<b>0,009*</b>	-11,9759 ; -3,2240
<b>Ketorolaco 1000 µM</b>	<b>Q1</b> Necrosis	17,22	2,9957	<b>0,002*</b>	-19,0631 ; -8,1501
	<b>Q2</b> Ap. Tardía	22,45	3,4035	<b>0,001*</b>	-25,5355 ; -13,6711
	<b>Q3</b> Negativo	52,52	2,9221	<b>0,000*</b>	28,9872 ; 45,6193
	<b>Q4</b> Apoptosis	7,80	0,9057	<b>0,030*</b>	-7,5370 ; -0,6496

<sup>a</sup> Desviación Estándar; <sup>b</sup> Intervalo de Confianza; \* Diferencias significativas.

En la Fig. 13 y tabla 13 se muestran los resultados obtenidos tras 12 h de tratamiento con Metamizol a diferentes dosis. Como podemos observar a la dosis más baja (1 µM) no se produjo ningún cambio significativo en comparación con el control, mientras que a la dosis de 10 µM se observó un incremento significativo del porcentaje de células en apoptosis temprana y una disminución significativa de células vivas. Para dosis altas (100 y 1000 µM) se observó un aumento significativo en el porcentaje de células en apoptosis, tanto temprana como tardía, y en necrosis.

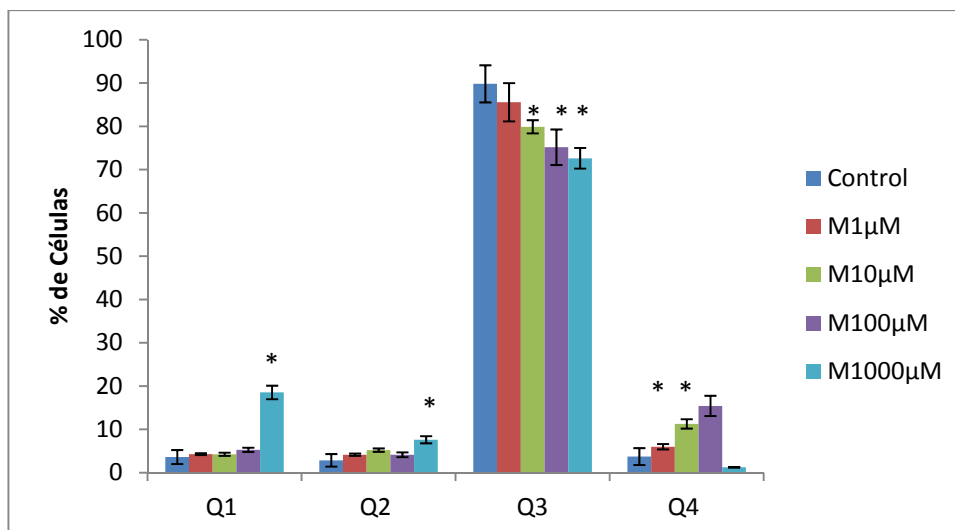


Figura 13. Estudio mediante citometría de flujo de la inducción de apoptosis mediante doble marcaje con Annexina V y IP. Expresado como el porcentaje de células marcadas con Annexina V e IP después de su tratamiento durante 12 h con Metamizol a la dosis de 1, 10, 100 y 1000 µM. Q1 (necrosis: Ann V<sup>-</sup>, IP<sup>+</sup>), Q2 (apoptosis tardía: Ann V<sup>+</sup>, IP<sup>+</sup>), Q3 (Negativo: Ann V<sup>-</sup>, IP<sup>-</sup>), Q4 (apoptosis: Ann V<sup>+</sup>, IP<sup>-</sup>). \*p<0.05.

**Tabla 13. Porcentaje de células marcadas con Annexina V y/o IP analizadas mediante citometría de flujo después de su tratamiento durante 12 h con Metamizol.**

Tratamiento		% de Células (Valor medio)	SD <sup>a</sup>	VALOR P	I,C, (95%) <sup>b</sup>
<b>Control</b>	Q1 Necrosis	3,61	1,6163	-	-
	Q2 Ap. Tardía	2,84	1,4530	-	-
	Q3 Negativo	89,82	4,2866	-	-
	Q4 Apoptosis	3,71	1,9480	-	-
<b>Metamizol 1 µM</b>	Q1 Necrosis	4,29	0,2179	0,699	-1,7100 ; 2,3584
	Q2 Ap. Tardía	4,14	0,2619	0,261	-4,7906 ; 2,1989
	Q3 Negativo	85,57	4,4218	0,259	-4,3304 ; 12,8221
	Q4 Apoptosis	5,99	0,6133	0,073	-4,8724 ; 0,3124
<b>Metamizol 10 µM</b>	Q1 Necrosis	4,24	0,3766	0,477	-2,7105 ; 1,4638
	Q2 Ap. Tardía	5,20	0,3907	0,100	-5,7358 ; 1,0191
	Q3 Negativo	79,29	1,5186	<b>0,006*</b>	4,7286 ; 16,3330
	Q4 Apoptosis	11,26	1,0781	<b>0,001*</b>	-10,4722 ; -4,6277
<b>Metamizol 100 µM</b>	Q1 Necrosis	5,27	0,4917	0,104	-3,7951 ; 0,4885
	Q2 Ap. Tardía	4,13	0,5604	0,159	-3,2813 ; 0,7096
	Q3 Negativo	75,18	4,0980	<b>0,006*</b>	6,4474 ; 22,8391
	Q4 Apoptosis	15,42	2,3441	<b>0,001*</b>	-16,0230 ; -7,4069
<b>Metamizol 1000µM</b>	Q1 Necrosis	18,53	1,5616	<b>0,000*</b>	-18,5161 ; -11,3105
	Q2 Ap. Tardía	7,60	0,8265	<b>0,008*</b>	-7,4330 ; -2,0736
	Q3 Negativo	72,62	2,3843	<b>0,004*</b>	9,3405 ; 25,0661
	Q4 Apoptosis	1,24	0,0850	0,094	-0,6622 ; 5,5889

<sup>a</sup> Desviación Estándar; <sup>b</sup> Intervalo de Confianza; \* Diferencias significativas.

Los resultados del estudio no mostraron cambios en las células de la línea osteoblástica MG63 tratadas con dosis bajas de Aspirina (1 y 10  $\mu\text{M}$ ). Por el contrario a dosis altas (20, 100, 1000  $\mu\text{M}$ ) se mostró un aumento significativo del porcentaje de células en apoptosis temprana y tardía y disminución del número de células vivas tras 12 h de tratamiento. Solo a partir de la dosis de 1000  $\mu\text{M}$  se observó un incremento de células necróticas (Fig. 14 y tabla 14).

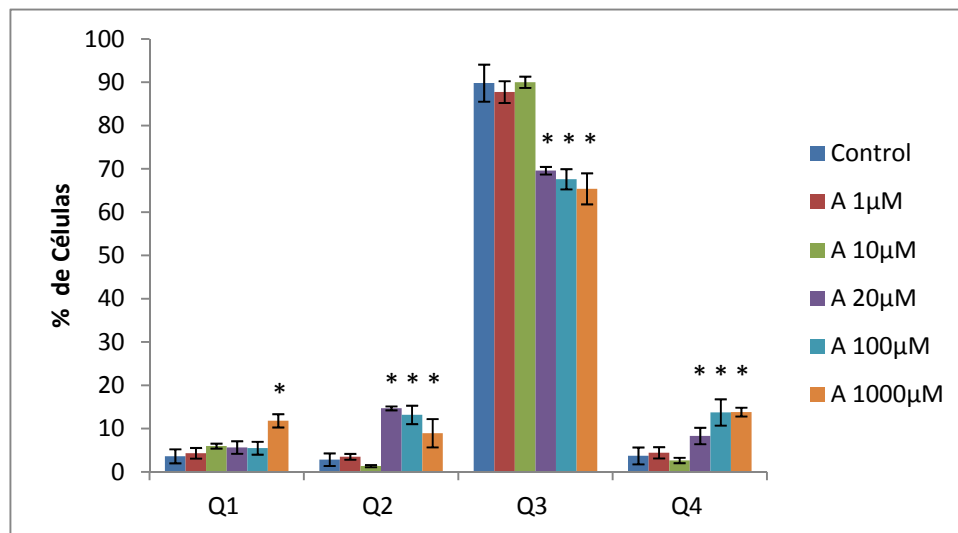


Figura 14. Estudio mediante citometría de flujo de la inducción de apoptosis mediante doble marcaje con Annexina V e IP. Expresado como el porcentaje de células marcadas con Annexina V e IP después de su tratamiento durante 12 h con Aspirina a la dosis de 1, 10, 100 y 1000  $\mu\text{M}$ . Q1 (necrosis: Ann V<sup>-</sup>, IP<sup>+</sup>), Q2 (apoptosis tardía: Ann V<sup>+</sup>, IP<sup>+</sup>), Q3 (Negativo: Ann V<sup>-</sup>, IP<sup>-</sup>), Q4 (apoptosis: Ann V<sup>+</sup>, IP<sup>-</sup>). \* $p < 0.05$ .

**Tabla 14. Porcentaje de células marcadas con Annexina V y/o IP analizadas mediante citometría de flujo después de su tratamiento durante 12 h con Aspirina.**

<i>Tratamiento</i>		<i>% de Células (Valor medio)</i>	<i>SD<sup>a</sup></i>	<i>VALOR P</i>	<i>I.C. (95%)<sup>b</sup></i>
<b>Control</b>	<b>Q1</b> Necrosis	3,61	1,6163	-	-
	<b>Q2</b> Ap. Tardía	2,84	1,4530	-	-
	<b>Q3</b> Negativo	89,82	4,2866	-	-
	<b>Q4</b> Apoptosis	3,71	1,9480	-	-
<b>Aspirina 1 µM</b>	<b>Q1</b> Necrosis	4,31	1,2265	0,582	-3,9525 ; 2,5525
	<b>Q2</b> Ap. Tardía	3,50	0,6701	0,518	-0,3218 ; 1,9117
	<b>Q3</b> Negativo	87,76	2,5171	0,513	-5,9085 ; 10,0285
	<b>Q4</b> Apoptosis	4,42	1,3001	0,627	-4,4641 ; 3,0441
<b>Aspirina 10 µM</b>	<b>Q1</b> Necrosis	5,97	0,5697	0,076	-5,1072 ; 0,3872
	<b>Q2</b> Ap. Tardía	1,34	0,2514	0,213	-1,9720 ; 4,9720
	<b>Q3</b> Negativo	90,02	1,3050	0,941	-7,3861 ; 6,9794
	<b>Q4</b> Apoptosis	2,65	0,6192	0,421	-2,2166 ; 4,3332
<b>Aspirina 20 µM</b>	<b>Q1</b> Necrosis	5,64	1,4516	0,182	-5,5058 ; 1,4592
	<b>Q2</b> Ap. Tardía	14,69	0,4531	<b>0,000*</b>	-14,2832 ; -9,4034
	<b>Q3</b> Negativo	69,59	0,8826	<b>0,012*</b>	10,1319 ; 30,3281
	<b>Q4</b> Apoptosis	8,31	1,8938	<b>0,043*</b>	-8,9583 ; -0,2482
<b>Aspirina 100 µM</b>	<b>Q1</b> Necrosis	5,48	1,4807	0,215	-5,3772 ; 1,6505
	<b>Q2</b> Ap. Tardía	13,18	2,1219	<b>0,002*</b>	-14,4558 ; -6,2108
	<b>Q3</b> Negativo	67,61	2,3404	<b>0,001*</b>	14,3844 ; 30,0422
	<b>Q4</b> Apoptosis	13,74	3,0390	<b>0,009*</b>	-15,8230 ; -4,2502
<b>Aspirina 1000µM</b>	<b>Q1</b> Necrosis	11,81	1,5383	<b>0,003*</b>	-11,7735 ; -4,6197
	<b>Q2</b> Ap. Tardía	8,94	3,2706	<b>0,042*</b>	-11,8335 ; -0,3597
	<b>Q3</b> Negativo	65,41	3,5840	<b>0,002*</b>	15,4499 ; 33,3633
	<b>Q4</b> Apoptosis	13,82	1,0186	<b>0,001*</b>	-13,6404 ; -6,5929

<sup>a</sup>Desviación Estándar; <sup>b</sup>Intervalo de Confianza; \* Diferencias significativas.

### 1.3.2. Determinación de la inducción de apoptosis por microscopia de fluorescencia.

Los resultados obtenidos a través de esta técnica, presentan perfiles equivalentes a los que han sido obtenidos mediante la técnica de citometría; si bien, hemos de tener en cuenta que aquí no se distingue entre apoptosis temprana y apoptosis tardía.

Donde mayor discrepancia observamos, entre los datos obtenidos por citometría y los obtenidos por microscopía, es en el tratamiento con la Aspirina. En la técnica microscópica se obtiene un porcentaje importante de células apoptóticas a la dosis de 10 µM, que no se detecta de forma significativa por citometría de flujo.



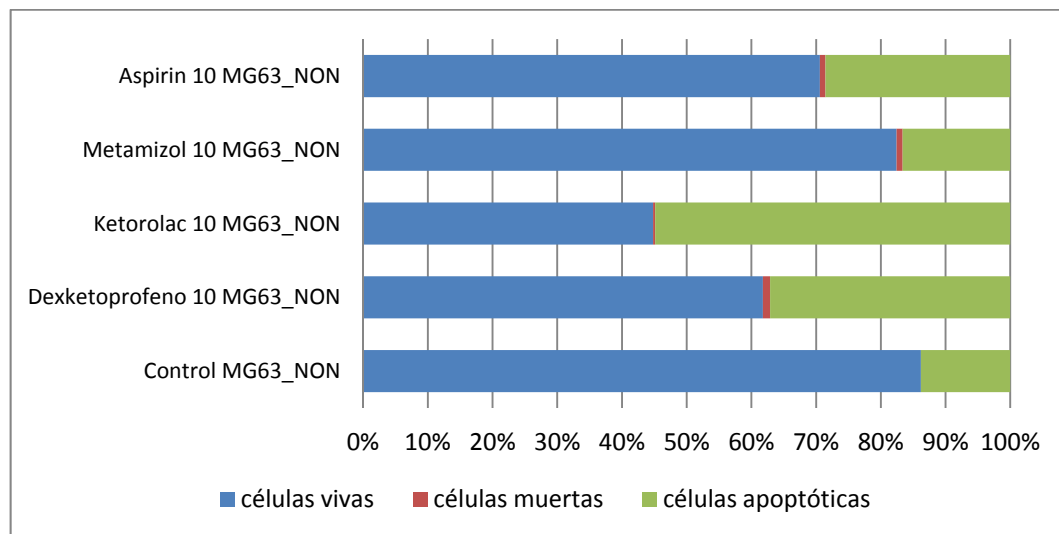


Figura 15. Estudio mediante microscopía de fluorescencia de la inducción de apoptosis mediante doble marcaje con Hoechst e IP. Expresado como porcentaje de células marcadas con Hoechst y/o IP después de su tratamiento durante 24 h con Dexketoprofeno, Ketorolaco, Metamizol y Aspirina a la dosis de 10  $\mu$ M.

#### 1.4. Estudio de la citotoxicidad de los AINEs sobre la línea MG63.

En relación con el estudio de citotoxicidad, los resultados obtenidos muestran que ninguno de los AINEs estudiados a las dosis ensayadas (1 y 10  $\mu$ M) produce toxicidad celular, al no detectarse un porcentaje de LDH libre en el sobrenadante de cultivo significativamente superior al del grupo control (Fig. 16).

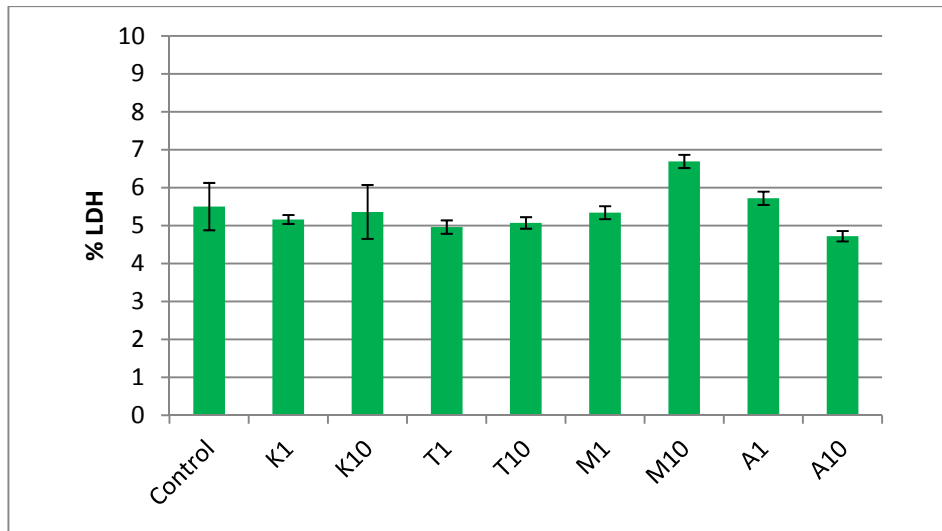


Figura 16. Determinación espectrofotométrica del porcentaje de LDH liberada como consecuencia del tratamiento con distintas dosis (1 y 10  $\mu\text{M}$ ) de Dexketoprofeno, Ketorolaco, Metamizol y Aspirina. El grupo control son células bajo las mismas condiciones de cultivo en ausencia de AINE.

## 2. Efecto de los AINEs sobre la diferenciación celular de línea MG63.

El estudio del efecto de los AINEs sobre la diferenciación celular se ha determinado valorando su acción sobre el proceso de mineralización, la síntesis de colágeno y la actividad fosfatasa alcalina.

### 2.1. Estudio de la mineralización.

Los ensayos de mineralización, realizados con medio osteogénico en la línea celular MG63, mostraron la aparición de nódulos de color rojo, como consecuencia de su tinción con Alizarina roja, a partir de los 15 de cultivo, siendo éstos de mayor tamaño y más numerosos a partir de los 20 días.

Los resultados obtenidos en los cultivos realizados en medio osteogénico en presencia de Dexketoprofeno, Ketorolaco o Metamizol a las dosis de 1 y 10  $\mu\text{M}$  y Aspirina a las dosis de 1, 10 y 20  $\mu\text{M}$ , mostraron una inhibición, tanto en el número de nódulos como en el tamaño de los mismos, a partir de los 15 días (tabla 15). La respuesta observada sobre el proceso de mineralización, en el tratamiento con Aspirina, es inhibitoria, pero ligeramente menor que la detectada en el tratamiento con los otros AINEs estudiado.

En la Fig. 17 se muestran fotografías tomadas al microscopio óptico de cultivos en medio osteogénico a distintos tiempos en donde se observan nódulos de distinto tamaño.

**Tabla 15. Estudio cualitativo de la mineralización de la línea celular MG63 mediante la formación de nódulos, en relación con el tiempo, en medio de cultivo osteogénico suplementado con distintos AINEs: Dexketoprofeno, Ketorolaco y Metamizol (1 y 10  $\mu\text{M}$ ) y Aspirina (1, 10 y 20  $\mu\text{M}$ ).**

Tratamiento	7 días		15 días		20 días	
	Nº nódulos	Tamaño nódulos	Nº nódulos	Tamaño nódulos	Nº nódulos	Tamaño nódulos
Control	-	-	+	40-80 $\mu\text{m}$	++	80-150 $\mu\text{m}$
Aspirina 1 $\mu\text{M}$	-	-	$\pm$	10-40 $\mu\text{m}$	+	50-100 $\mu\text{m}$
Aspirina 10 $\mu\text{M}$	-	-	$\pm$	10-40 $\mu\text{m}$	+	50-100 $\mu\text{m}$
Aspirina 20 $\mu\text{M}$	-	-	$\pm$	10-40 $\mu\text{m}$	+	50-100 $\mu\text{m}$
Dexketoprofeno 1 $\mu\text{M}$	-	-	-	'-	+	50-100 $\mu\text{m}$
Dexketoprofeno 10 $\mu\text{M}$	-	-	-	-	-	-
Ketorolaco 1 $\mu\text{M}$	-	-	-	'-	+	40-80 $\mu\text{m}$
Ketorolaco 10 $\mu\text{M}$	-	-	-	-	+	40-80 $\mu\text{m}$
Metamizol 1 $\mu\text{M}$	-	-	-	'-	+	10-40 $\mu\text{m}$
Metamizol 10 $\mu\text{M}$	-	-	-	-	-	-

- No se detecta presencia de nódulos;  $\pm$  de 0 a 10 nódulos por pocillo; + de 5 a 20 nódulos por pocillo; ++ más de 20 nódulos por pocillo.

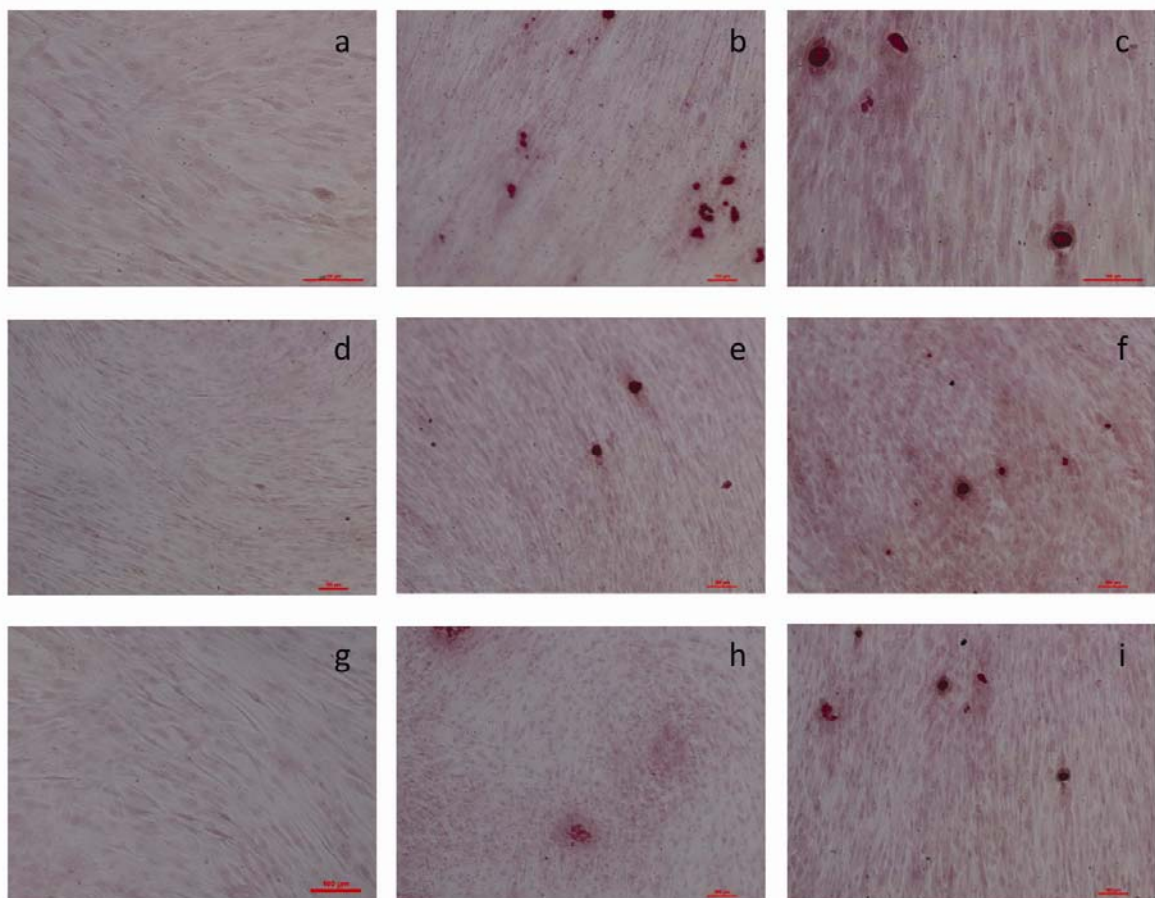
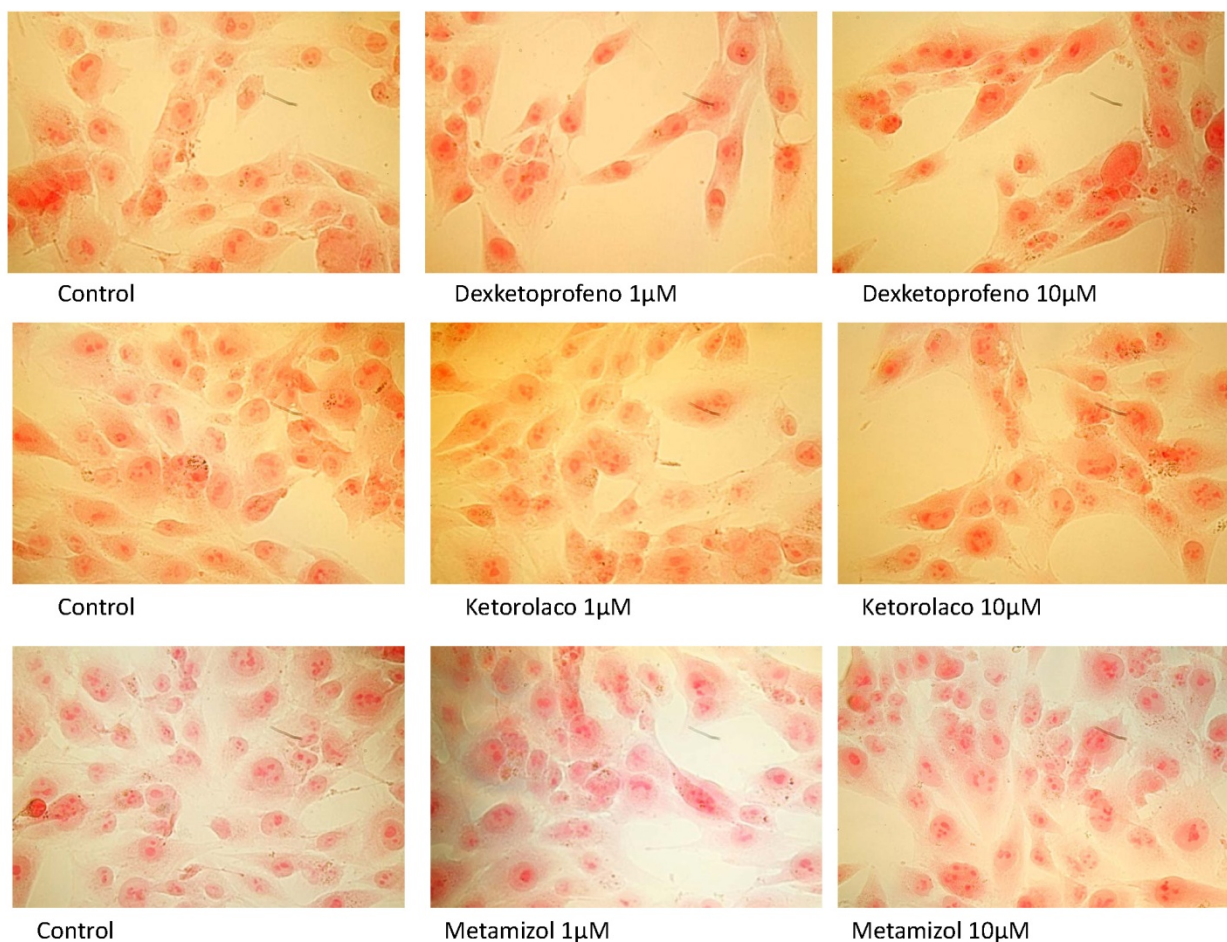


Figura 17. Imagen al microscopio óptico de las células osteoblasticas (MG63) en medio osteogénico en presencia de distintos AINEs. La lectura se realizó mediante tinción según el método de la Alizarina roja a los 7, 15 y 20 días de iniciado el tratamiento. a) control 7días; b) control 15días; c) control 20días; d) Dexketoprofeno 7días; e) Dexketoprofeno 15días; f) Dexketoprofeno 20días; g) Aspirina 7días; h) Aspirina 15días; i) Aspirina 20días. (— Escala 100 $\mu\text{m}$ ).

## 2.2. Estudio de la Síntesis de Fibras de Colágeno.

La síntesis de colágeno es uno de los parámetros de diferenciación del osteoblasto. En nuestro estudio hemos observado que el tratamiento de la línea celular MG63 durante 24 horas, con las distintas dosis de AINEs, no produce cambios apreciables en la síntesis de colágeno con respecto del control (células no tratadas); al ser analizada mediante microscopía óptica previa tinción con Sirius red. Como podemos observar en las Fig. 18 no se aprecian cambios en los distintos campos visualizados de las células bajo tratamiento con AINEs.



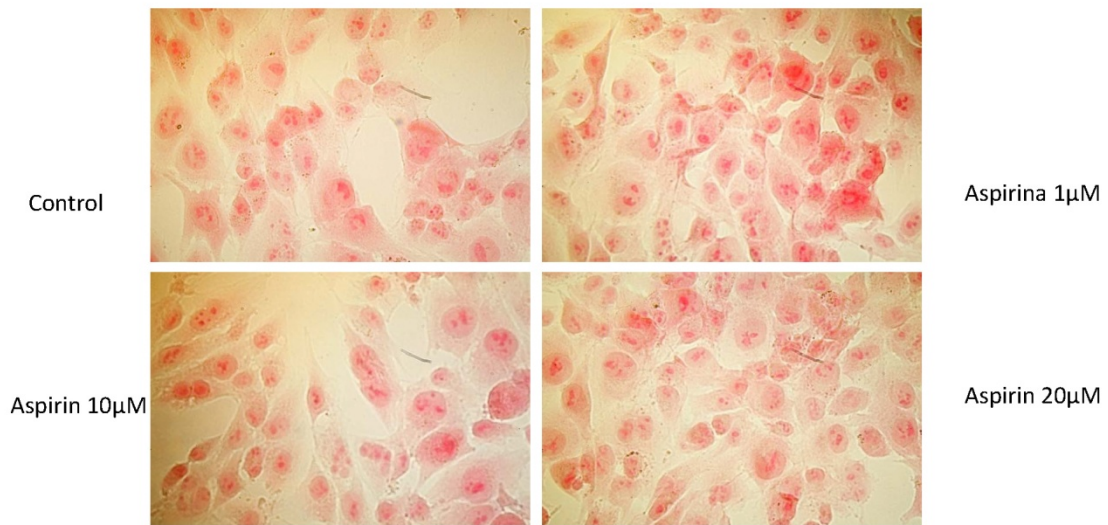


Figura 18. Fotografías tomadas al microscopio óptico de las células tratadas durante 24 h con distintas dosis de AINEs y teñidas con Sirius Red para visualizar la síntesis de fibras de colágeno.

### 2.3. Estudio de la Actividad Fosfatasa Alcalina (AP).

Otro de los parámetros comúnmente utilizados en relación con la diferenciación del osteoblasto es la actividad fosfatasa alcalina.

Los resultados obtenidos, en relación con este marcador bioquímico, después de 24 horas de tratamiento con las diferentes dosis de antiinflamatorios estudiados, muestran un descenso significativo de la expresión del mismo (tabla 16)

**Tabla 16. Actividad AP de la línea MG63 tras su tratamiento con diferentes AINEs a la dosis de 1 y 10  $\mu$ M, expresada en U/mg de proteínas.**

Tratamiento	Media	SD <sup>a</sup>	Valor P
Control	2.67	0.117	
Dexketoprofeno 1 $\mu$ M	1.77	0.253	<b>0.005*</b>
Dexketoprofeno 10 $\mu$ M	1.88	0.207	<b>0.005*</b>
Ketorolaco 1 $\mu$ M	1.65	0.338	<b>0.008*</b>
Ketorolaco 10 $\mu$ M	1.79	0.184	<b>0.002*</b>
Metamizol 1 $\mu$ M	1.69	0.030	<b>0.000*</b>
Metamizol 10 $\mu$ M	1.92	0.083	<b>0.001*</b>
Aspirina 1 $\mu$ M	1.77	0.137	<b>0.001*</b>
Aspirina 10 $\mu$ M	1.95	0.173	<b>0.005*</b>
Aspirina 20 $\mu$ M	1.88	0.202	<b>0.004*</b>

<sup>a</sup>Desviación Estándar, \* diferencias significativas.



### 3. Efecto de los AINEs sobre la adhesividad celular.

Otro parámetro estudiado es la adhesión celular, de gran trascendencia, junto a la proliferación, en los procesos de regeneración tras un traumatismo óseo.

El estudio de la adhesividad celular mostró, como se puede observar en la Fig. 19 y tabla 17, que la presencia de Dexketoprofeno a la dosis de 1 y 10  $\mu\text{M}$  aumenta la adhesión celular ligeramente en comparación con las células no tratadas (grupo control). Siendo esta adhesión mayor a los 60 minutos para 1 y 10  $\mu\text{M}$  y a los 90 y 180 minutos para 10  $\mu\text{M}$ .

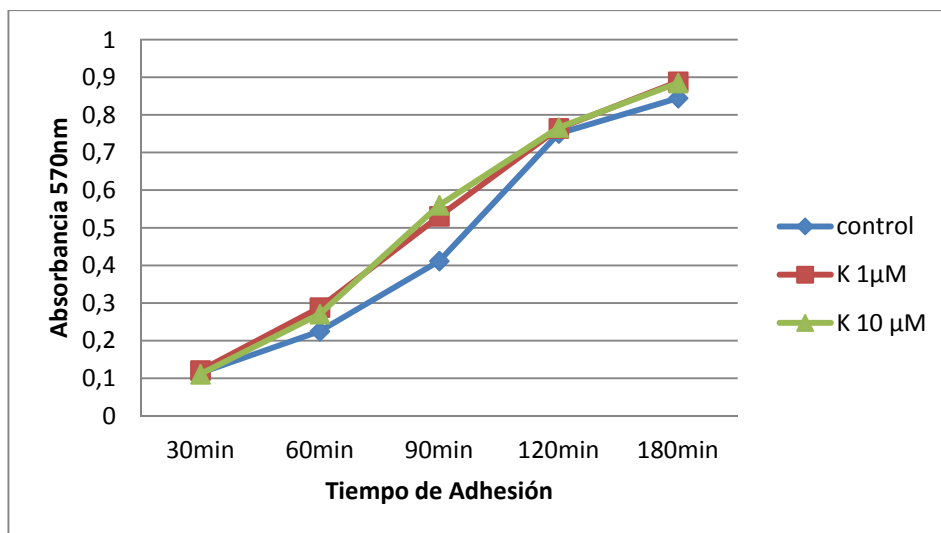


Figura 19. Perfil de adhesión mostrado por la línea celular MG63, como consecuencia de su tratamiento con Dexketoprofeno a la dosis de 1 y 10  $\mu\text{M}$ , a distintos tiempos y determinado por espectrofotometría mediante el método del MTT.



**Tabla 17. Adhesión de la línea celular MG63, tratada con Dexketoprofeno a la dosis de 1 y 10  $\mu$ M determinada por espectrofotometría mediante el método del MTT.**

Tiempo de Adhesión	Dexketoprofeno	Viabilidad Celular (valor medio de la DO <sup>a</sup> )	SD <sup>b</sup>	VALOR P
30min	CONTROL	0.1141	0.0118	-
	1 $\mu$ M	0.1210	0.0089	0.223
	10 $\mu$ M	0.1110	0.0075	0.545
60min	CONTROL	0.2251	0.0168	-
	1 $\mu$ M	0.2881	0.0312	<b>0.000*</b>
	10 $\mu$ M	0.2706	0.0456	<b>0.027*</b>
90min	CONTROL	0.4117	0.0760	-
	1 $\mu$ M	0.4871	0.1177	0.151
	10 $\mu$ M	0.5330	0.0801	<b>0.010*</b>
120min	CONTROL	0.7507	0.1096	-
	1 $\mu$ M	0.7643	0.0611	0.763
	10 $\mu$ M	0.7665	0.0623	0.729
180min	CONTROL	0.8447	0.0702	-
	1 $\mu$ M	0.9221	0.0538	<b>0.027*</b>
	10 $\mu$ M	0.8850	0.0561	0.272

<sup>a</sup> Densidad Óptica, <sup>b</sup> Desviación estándar; \* Diferencias significativas.

Los resultados obtenidos para el antiinflamatorio Ketorolaco mostraron un aumento significativo de la adhesividad de la línea MG63 a partir de los 60 minutos con la dosis de 10  $\mu$ M. Mientras que la dosis de 1  $\mu$ M solo mostró efecto significativo a partir de los 90 minutos de incubación (Fig. 20 y tabla 18).

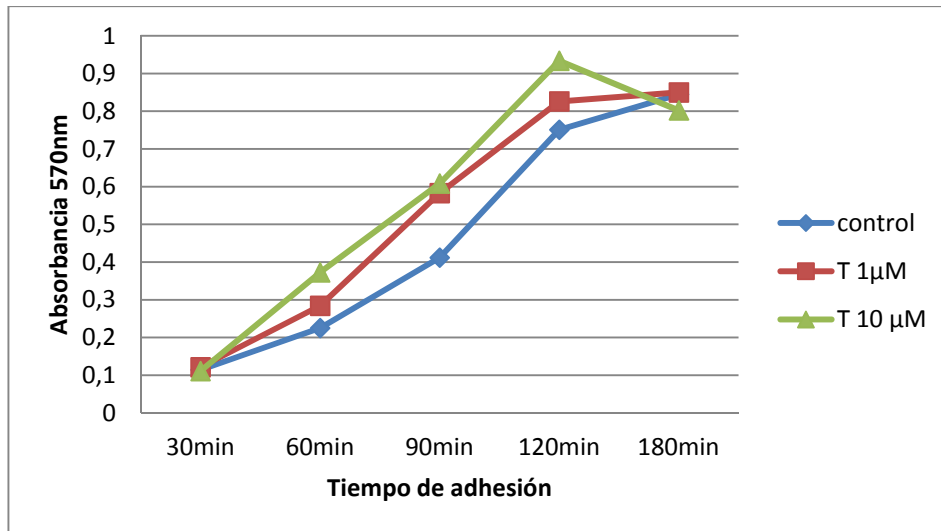


Figura 20. Perfil de adhesión mostrado por la línea celular MG63, como consecuencia de su tratamiento con Ketorolaco a la dosis de 1 y 10 µM, a distintos tiempos y determinado por espectrofotometría mediante el método del MTT.

**Tabla 18. Adhesión de la línea celular MG63 tratada con Ketorolaco a la dosis de 1 y 10 µM determinada por espectrofotometría mediante el método del MTT.**

Tiempo de Adhesión	Ketorolaco	Viabilidad Celular (valor medio de la DO <sup>a</sup> )	SD <sup>b</sup>	VALOR P
30min	CONTROL	0.1141	0.0118	-
	1µM	0.1126	0.0082	0.775
	10 µM	0.1312	0.0214	0.084
60min	CONTROL	0.2251	0.0168	-
	1 µM	0.2840	0.0833	0.113
	10 µM	0.3726	0.0865	<b>0.002*</b>
90min	CONTROL	0.4117	0.0760	-
	1 µM	0.5827	0.0899	<b>0.002*</b>
	10 µM	0.6082	0.0977	<b>0.001*</b>
120min	CONTROL	0.7507	0.1096	-
	1 µM	0.8260	0.0899	0.174
	10 µM	0.9338	0.1115	<b>0.005*</b>
180min	CONTROL	0.8447	0.0702	-
	1 µM	0.8498	0.0908	0.904
	10 µM	0.8020	0.0916	0.320

<sup>a</sup> Densidad Óptica, <sup>b</sup> Desviación estándar; \* Diferencias significativas.

En la Fig. 21 y en la tabla 19 se muestran los resultados obtenidos cuando las células osteoblásticas fueron tratadas con Metamizol, como podemos observar la adhesión celular aumentó significativamente a los 90 y 120 minutos de incubación con la dosis de 10  $\mu\text{M}$ , mientras que a la dosis de 1  $\mu\text{M}$  solo se detecta efecto significativo a los 120 minutos.

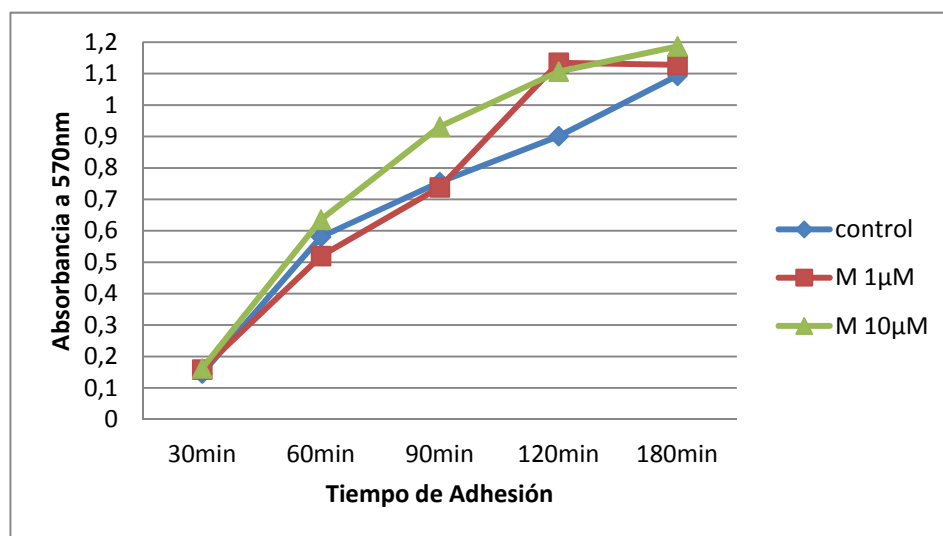


Figura 21. Perfil de adhesión mostrado por la línea celular MG63, como consecuencia de su tratamiento con Metamizol a la dosis de 1 y 10  $\mu\text{M}$ , a distintos tiempos y determinado por espectrofotometría mediante el método del MTT.

**Tabla 19. Adhesión de la línea celular MG63 tratada con Metamizol a la dosis de 1 y 10  $\mu\text{M}$  determinada por espectrofotometría mediante el método del MTT.**

Tiempo de Adhesión	Metamizol	Viabilidad Celular (valor medio de la DO <sup>a</sup> )	SD <sup>b</sup>	VALOR P
30min	CONTROL	0.1457	0.0221	-
	1 $\mu\text{M}$	0.1585	0.0071	0.191
	10 $\mu\text{M}$	0.1620	0.0341	0.323
60min	CONTROL	0.5807	0.1073	-
	1 $\mu\text{M}$	0.5194	0.0736	0.226
	10 $\mu\text{M}$	0.6354	0.1983	0.510
90min	CONTROL	0.7547	0.1706	-
	1 $\mu\text{M}$	0.7380	0.0965	0.825
	10 $\mu\text{M}$	0.9313	0.1162	<b>0.034*</b>
120min	CONTROL	0.9011	0.1513	-
	1 $\mu\text{M}$	1.1347	0.1506	<b>0.010*</b>
	10 $\mu\text{M}$	1.1064	0.1155	<b>0.015*</b>
180min	CONTROL	1.0932	0.1197	-
	1 $\mu\text{M}$	1.1278	0.2469	0.745
	10 $\mu\text{M}$	1.2485	0.1897	0.086

<sup>a</sup> Densidad Óptica, <sup>b</sup> Desviación estándar; \* Diferencias significativas.

El comportamiento mostrado en relación con la adhesión celular de la línea MG63 tratada con diferentes dosis de Aspirina, se recoge en la Fig. 22 y tabla 20, dónde se puede observar que no hubo ningún cambio significativo en comparación con el grupo control (células no tratadas).

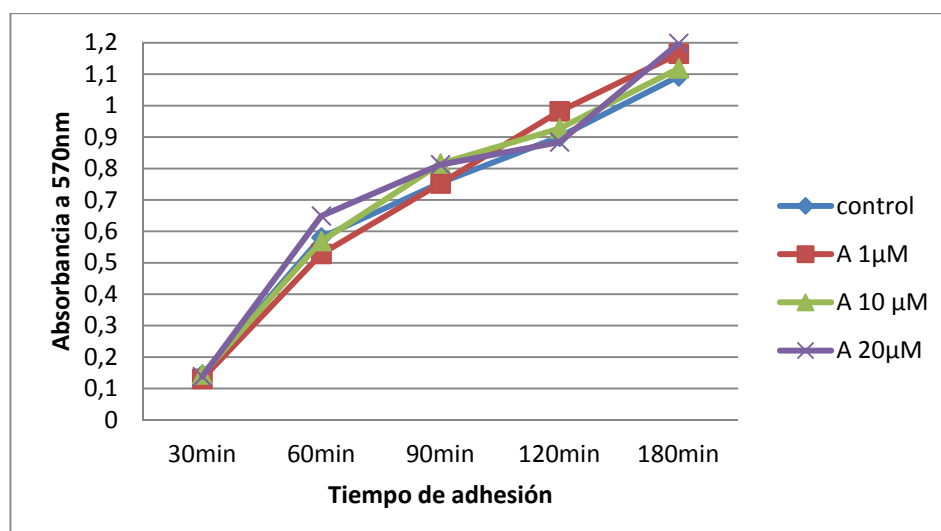


Figura 22. Perfil de adhesión mostrado por la línea celular MG63, como consecuencia de su tratamiento con Aspirina a la dosis de 1 y 10 µM, a distintos tiempos y determinado por espectrofotometría mediante el método del MTT.

Tabla 20. Adhesión de la línea celular MG63 tratada con Aspirina a la dosis de 1 y 10 µM determinada por espectrofotometría mediante el método del MTT.

Tiempo de Adhesión	Aspirina	Viabilidad Celular (valor medio de la DO <sup>a</sup> )	SD <sup>b</sup>	VALOR P
30min	CONTROL	0.1441	0.0210	-
	1µM	0.1305	0.0084	0.127
	10 µM	1.1446	0.0307	0.969
	20 µM	0.1378	0.0210	0.564
60min	CONTROL	0.5807	0.1073	-
	1 µM	0.5283	0.0616	0.273
	10 µM	0.5688	0.1042	0.832
	20 µM	0.6488	0.1293	0.271
90min	CONTROL	0.7547	0.1706	-
	1 µM	0.7525	0.1456	0.980
	10 µM	0.8157	0.1398	0.460
	20 µM	0.8122	0.0977	0.454
120min	CONTROL	0.9011	0.1513	-
	1 µM	0.9820	0.1430	0.324
	10 µM	0.9274	0.1393	0.741
	20 µM	0.8840	0.2954	0.895
180min	CONTROL	1.0932	0.1197	-
	1 µM	1.1652	0.1933	0.419
	10 µM	1.1182	0.1179	0.701
	20 µM	1.2732	0.1893	0.055

<sup>a</sup> Densidad Óptica, <sup>b</sup> Desviación estándar; \* Diferencias significativas.

#### 4. Efecto de los AINEs sobre el fenotipo.

El estudio del efecto de los AINEs analizado sobre el perfil antigénico se ha centrado en el estudio de cuatro marcadores, que son considerados modulables en el osteoblasto: CD54, CD80, CD86 y HLA-DR.

El tratamiento con Dexketoprofeno a las dosis 1 y 10  $\mu\text{M}$  durante 24 h se muestra en la Fig. 23 y tabla 21. Cabe señalar un aumento en la expresión de CD54 a ambas dosis, mientras que el CD80 y CD86 disminuyen ligeramente solo a la dosis de 1  $\mu\text{M}$ .

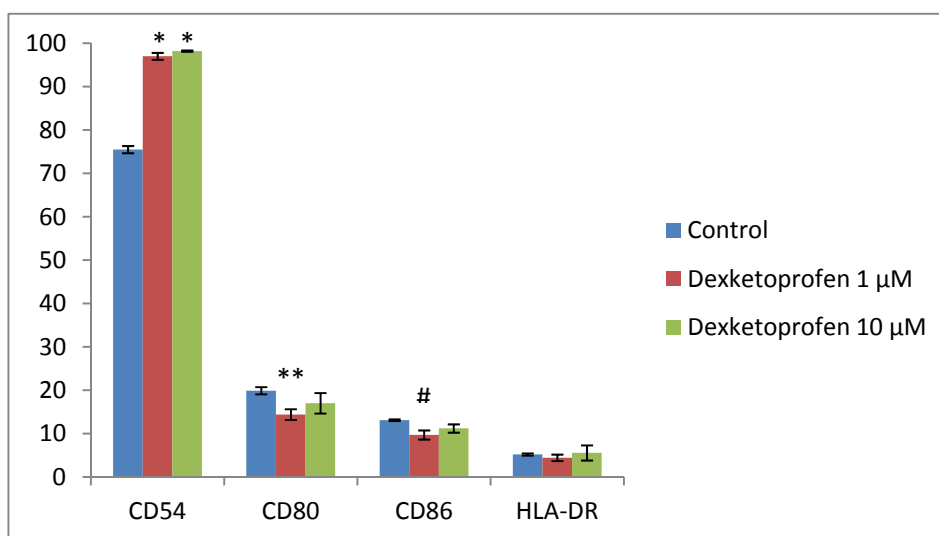


Figura 23. Porcentaje de expresión de distintos marcadores de superficie de los osteoblastos tratados durante 24 h con la dosis de 1 y 10  $\mu\text{M}$  de Dexketoprofeno. \* $p < 0.01$ ; \*\* $p = 0.003$ ; # $p = 0.005$

**Tabla 21. Expresión de los antígenos CD54, CD80, CD86, HLA-DR en células tumorales MG63, tras 24 h de tratamiento con Dexketoprofeno, mediante citometría de flujo.**

Tratamiento	Anticuerpo monoclonal							
	CD54		CD80		CD86		HLA-DR	
	%, SD <sup>a</sup>	p	%, SD <sup>a</sup>	p	%, SD <sup>a</sup>	p	%, SD <sup>a</sup>	p
<b>Control</b>	75.5 (0.83)	-	19.9 (0.83)	-	13.1 (0.20)	-	5.2 (0.26)	-
<b>Dexketoprofen 1 μM</b>	97 (0.8)	<b>0.00*</b>	14.4 (1.24)	<b>0.003*</b>	9.7 (1.05)	<b>0.005*</b>	4.43 (0.75)	0.17
<b>Dexketoprofen 10 μM</b>	98.2 (0.15)	<b>0.00*</b>	17 (2.36)	0.11	11.2 (0.96)	0.06	5.56 (1.74)	0.73

<sup>a</sup> Desviación estándar, \* Diferencias Significativas.

En la Fig. 24 y tabla 22 se muestran el perfil antigénico mostrado por la línea celular MG63 como consecuencia de su tratamiento con Ketorolaco (1 y 10 μM). Como podemos observa el tratamiento con ambas dosis produce un incremento en el porcentaje de expresión del antígeno CD54. La expresión del antígeno CD86 disminuyó a la dosis de 10μM.

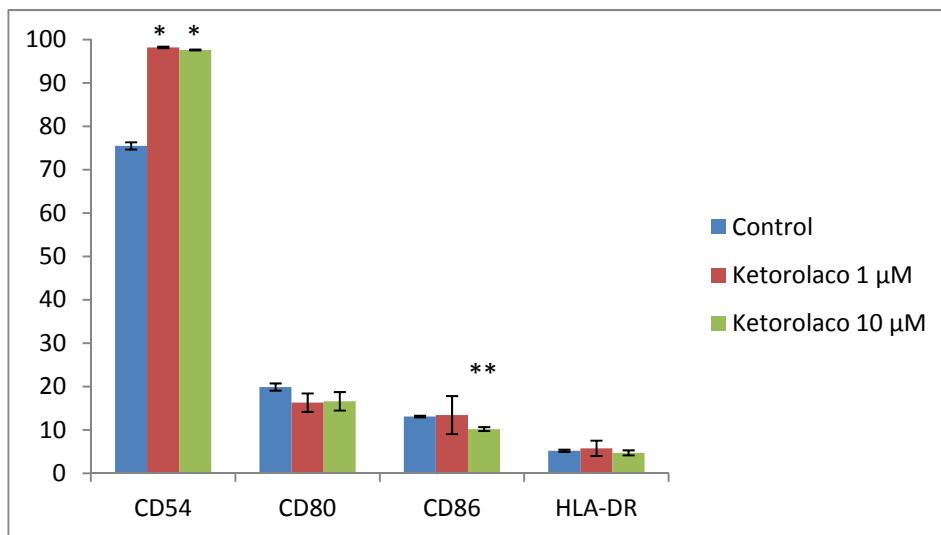


Figura 24. Porcentaje de expresión de distintos marcadores de superficie de los osteoblastos tratados durante 24 h con la dosis de 1 y 10 μM de Ketorolaco. \*p<0.01; \*\*p=0.001

**Tabla 22. Expresión de los antígenos CD54, CD80, CD86, HLA-DR en células de la línea MG63 tratadas durante 24 h con Ketorolaco, mediante citometría de flujo.**

Tratamiento	Anticuerpo monoclonal							
	CD54		CD80		CD86		HLA-DR	
	%, SD <sup>a</sup>	p	%, SD <sup>a</sup>	p	%, SD <sup>a</sup>	p	%, SD <sup>a</sup>	p
<b>Control</b>	75.5 (0.83)	-	19.9 (0.83)	-	13.1 (0.20)	-	5.2 (0.26)	-
<b>Ketorolaco 1 µM</b>	98.2 (0.17)	<b>0.00*</b>	16.3 (2.13)	0.11	13.43 (4.38)	0.926	5.76 (1.77)	0.63
<b>Ketorolaco 10 µM</b>	97.6 (0.1)	<b>0.00*</b>	16.6 (2.13)	0.055	10.2 (0.45)	<b>0.001*</b>	4.73 (0.58)	0.27

<sup>a</sup> Desviación estándar, \* Diferencias Significativas.

El tratamiento con Metamizol de los osteoblastos se tradujo en un aumento de la expresión de CD54 y una disminución en la expresión de los restantes marcadores estudiados, CD80, CD86 y HLA-DR en ambas dosis estudiadas (Fig. 25 y tabla 23).

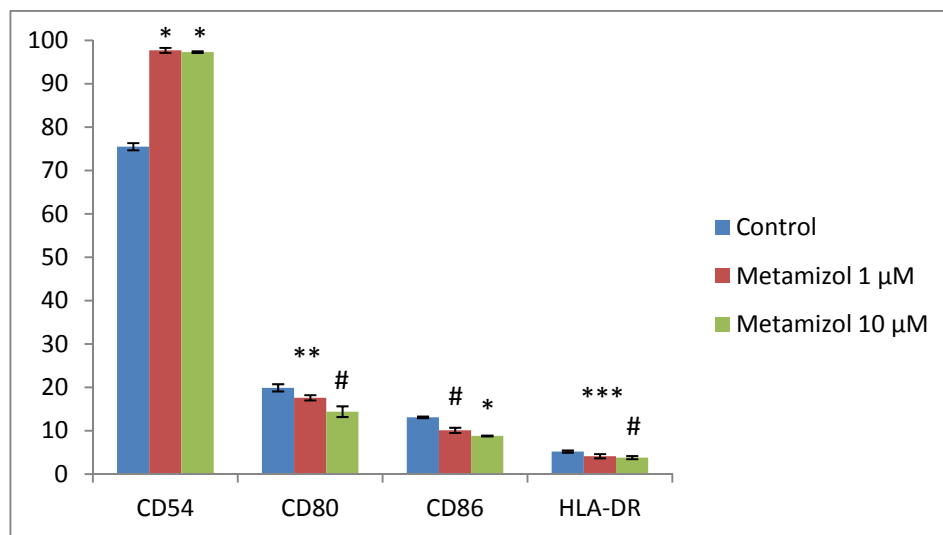


Figura 25. Porcentaje de expresión de distintos marcadores de superficie de los osteoblastos tratados durante 24 h con la dosis de 1 y 10 µM de Metamizol. \*p<0.01; \*\*p=0.018; \*\*\*p=0.03; #p<0.006



**Tabla 23. Expresión de los antígenos CD54, CD80, CD86, HLA-DR en células de la línea MG63 tratadas durante 24 h con Metamizol, mediante citometría de flujo.**

Tratamiento	Anticuerpo monoclonal							
	CD54		CD80		CD86		HLA-DR	
	%, SD <sup>a</sup>	p	%, SD <sup>a</sup>	p	%, SD <sup>a</sup>	p	%, SD <sup>a</sup>	p
<b>Control</b>	75.5 (0.83)	-	19.9 (0.83)	-	13.1 (0.20)	-	5.2 (0.26)	-
<b>Metamizol 1 µM</b>	97.7 (0.57)	<b>0.00*</b>	17.6 (0.61)	<b>0.018*</b>	10.1 (0.6)	<b>0.001*</b>	4.13 (0.49)	<b>0.03*</b>
<b>Metamizol 10 µM</b>	97.3 (0.2)	<b>0.00*</b>	14.4 (1.24)	<b>0.003*</b>	8.8 (0.1)	<b>0.00*</b>	3.8 (0.36)	<b>0.006*</b>

<sup>a</sup> Desviación estándar, \* Diferencias Significativas.

Al igual que en el tratamiento con los AINEs anteriormente comentados el tratamiento con Aspirina aumento la expresión de CD54 con las tres dosis estudiadas (Fig. 26 y tabla 24). Sola la expresión de CD86 disminuyó ligeramente a la dosis más alta.

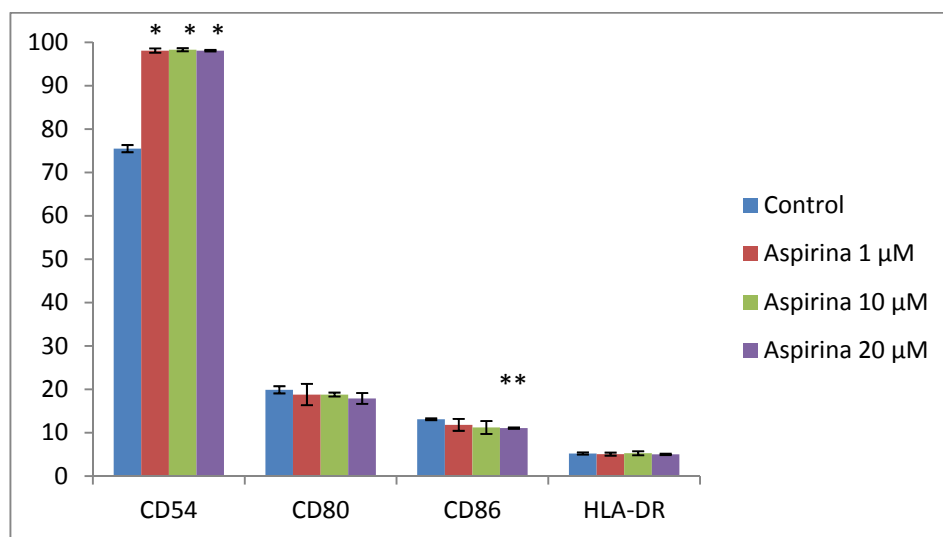


Figura 26. Porcentaje de expresión de distintos marcadores de superficie de los osteoblastos tratados durante 24 h con la dosis de 1, 10 y 20 µM de Aspirina. \*p<0.01; \*\*p=0.001

**Tabla 24. Expresión de los antígenos CD54, CD80, CD86, HLA-DR en células de la línea MG63 tratadas durante 24 h con Aspirina, mediante citometría de flujo.**

Tratamiento	Anticuerpo monoclonal							
	CD54		CD80		CD86		HLA-DR	
	%, SD <sup>a</sup>	p	%, SD <sup>a</sup>	p	%, SD <sup>a</sup>	p	%, SD <sup>a</sup>	p
<b>Control</b>	75.5 (0.83)	-	19.9 (0.83)	-	13.1 (0.20)	-	5.2 (0.26)	-
<b>Aspirina 1 µM</b>	98.1 (0.5)	<b>0.00*</b>	18.8 (2.45)	0.51	11.8 (1.37)	0.24	5.06 (0.35)	0.627
<b>Aspirina 10 µM</b>	98.3 (0.36)	<b>0.00*</b>	18.8 (0.45)	0.12	11.2 (1.49)	0.09	5.26 (0.46)	0.839
<b>Aspirina 20 µM</b>	98.1 (0.17)	<b>0.00*</b>	17.9 (1.25)	0.08	11.06 (0.17)	<b>0.001*</b>	5.0 (0.17)	0.335

<sup>a</sup> Desviación estándar, \* Diferencias Significativas.

## 5. Efecto de los AINEs sobre la capacidad fagocítica.

Los osteoblastos muestran capacidad fagocítica frente a diferentes dianas, por ello hemos estudiado el efecto de los AINEs sobre este parámetro funcional del osteoblasto.

En este sentido, el tratamiento con Dexketoprofeno a las dosis 1 y 10  $\mu\text{M}$ , produjo una inhibición significativa de la capacidad fagocítica de las células MG63 en comparación con el grupo control, como puede observarse bien en la Fig. 27, que muestra los histogramas de fluorescencia obtenidos por citometría de flujo, o bien en la tabla 25, en donde se recoge el porcentaje de células fagocíticas.

**Tabla 25. Porcentaje de células con capacidad fagocítica determinado mediante citometría de flujo, tratadas con Dexketoprofeno (1 y 10  $\mu\text{M}$ ).**

Tratamiento	% de Células Fagocitadas (m)	SD <sup>a</sup>	Valor P	I.C. <sup>b</sup> 95%
Control	98.89	1.5217		
Dexketoprofeno 1 $\mu\text{M}$	90.39	2.3180	<b>0.001*</b>	5.2366 ; 11.7633
Dexketoprofeno 10 $\mu\text{M}$	87.36	1.5534	<b>0.001*</b>	8.7849 ; 14.2616

<sup>a</sup> Desviación Estándar; <sup>b</sup> Intervalo de Confianza \* Diferencias significativas.

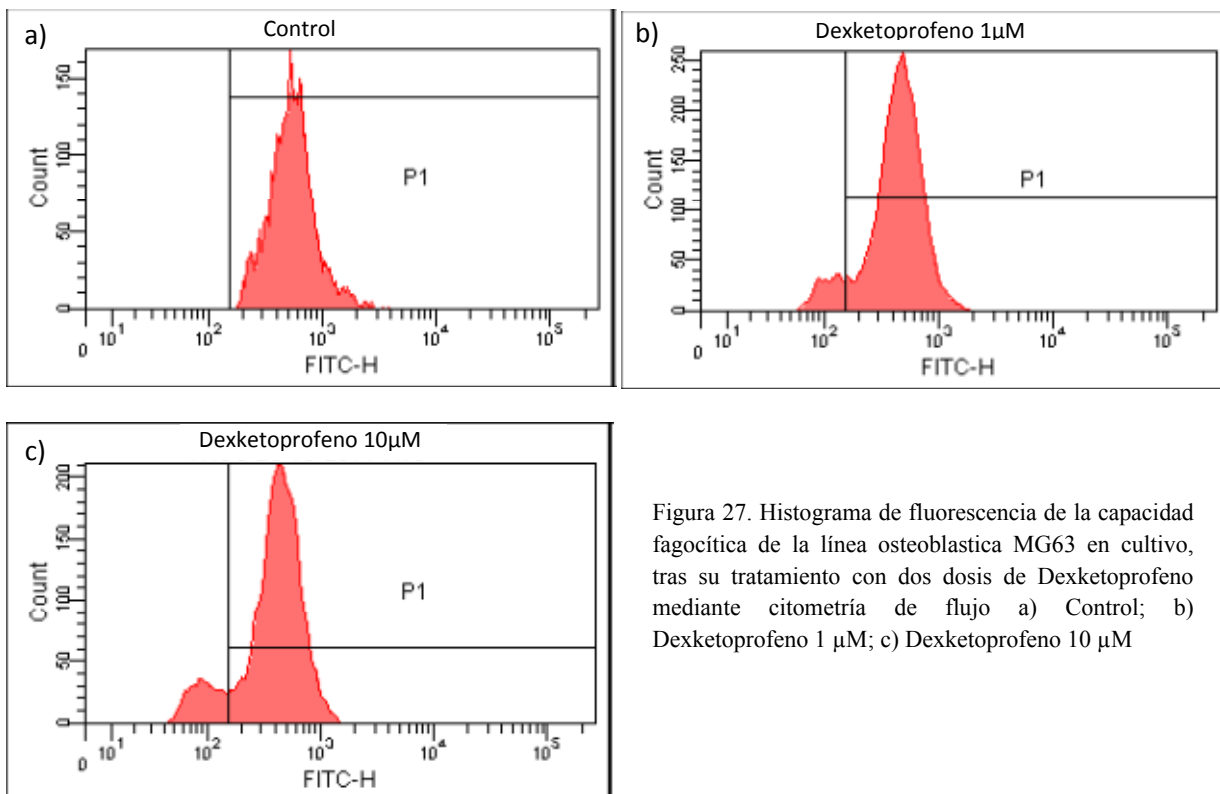


Figura 27. Histograma de fluorescencia de la capacidad fagocítica de la línea osteoblastica MG63 en cultivo, tras su tratamiento con dos dosis de Dexketoprofeno mediante citometría de flujo a) Control; b) Dexketoprofeno 1  $\mu$ M; c) Dexketoprofeno 10  $\mu$ M

En relación con los resultados obtenidos para el Ketorolaco después de 24 h de tratamiento con las dosis 1 y 10  $\mu$ M, se observó una disminución en la capacidad fagocítica, la cual es significativa en comparación con el control (células no tratadas) (Fig.28 y tabla 26).

**Tabla 26. Porcentaje de células con capacidad fagocítica determinado mediante citometría de flujo, tratadas con Ketorolaco (1 y 10  $\mu$ M).**

Tratamiento	Porcentaje de Células Fagocitadas (Valor Medio)	SD <sup>a</sup>	Valor P	I.C. <sup>b</sup> 95%
Control	98.89	1.5217		
Ketorolaco 1 $\mu$ M	68.93	7.2037	<b>0.017*</b>	12.6838 ; 47.2294
Ketorolaco 10 $\mu$ M	62.96	5.9877	<b>0.007*</b>	21.7698 ; 50.0768

<sup>a</sup> Desviación Estándar; <sup>b</sup> Intervalo de Confianza; \* Diferencias significativas.

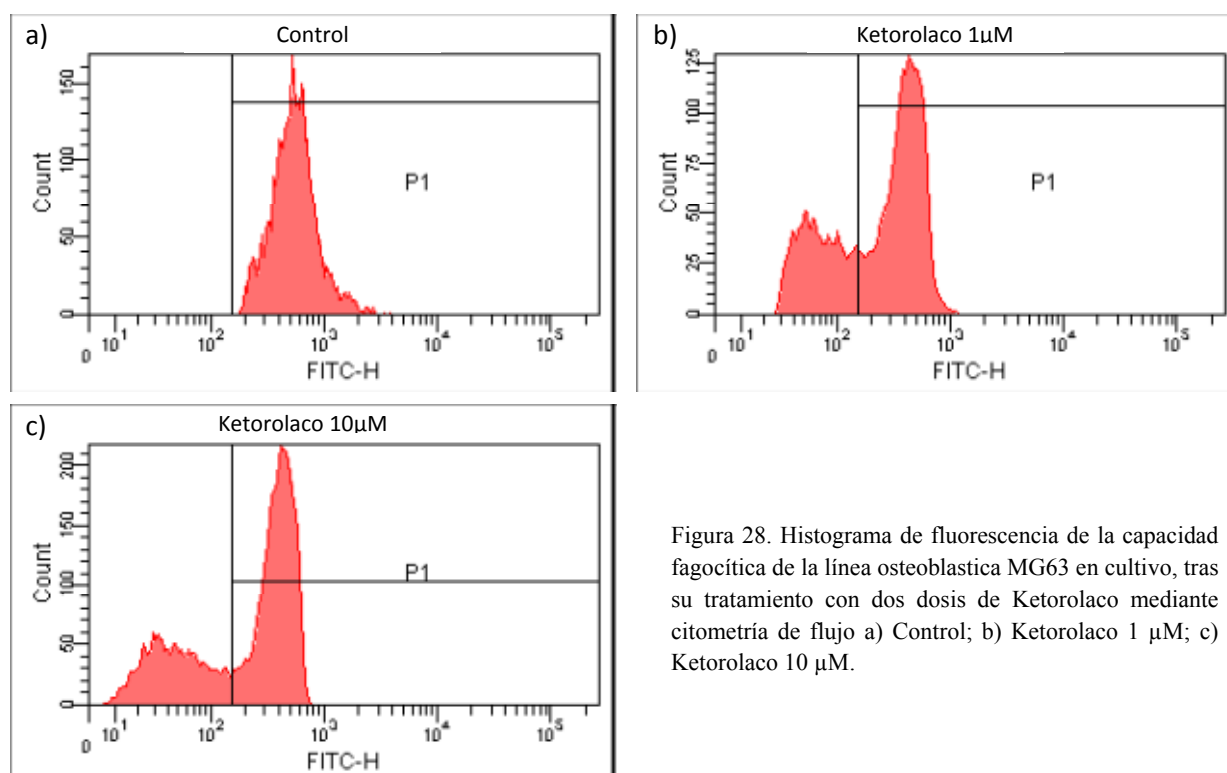


Figura 28. Histograma de fluorescencia de la capacidad fagocítica de la línea osteoblastica MG63 en cultivo, tras su tratamiento con dos dosis de Ketorolaco mediante citometría de flujo a) Control; b) Ketorolaco 1  $\mu\text{M}$ ; c) Ketorolaco 10  $\mu\text{M}$ .

El Metamizol mostró un efecto similar a los anteriores AINEs sobre la capacidad fagocítica del osteoblasto. Igualmente, observamos que el efecto guarda relación con la dosis de tratamiento utilizada (Fig. 29 y tabla 27).

**Tabla 27. Porcentaje de células con capacidad fagocítica determinado mediante citometría de flujo, tratadas con Metamizol (1 y 10 $\mu\text{M}$ ).**

Tratamiento	Porcentaje de Células Fagocitadas (Valor Medio)	SD <sup>a</sup>	Valor P	I.C. <sup>b</sup> 95%
Control	98.89	1.5217		
Metamizol 1 $\mu\text{M}$	78.20	1.9287	<b>0.000*</b>	17.7698 ; 23.6715
Metamizol 10 $\mu\text{M}$	65.10	11.8528	<b>0.038*</b>	4.7451 ; 62.8348

<sup>a</sup> Desviación Estándar; <sup>b</sup> Intervalo de Confianza; \* Diferencias significativas.

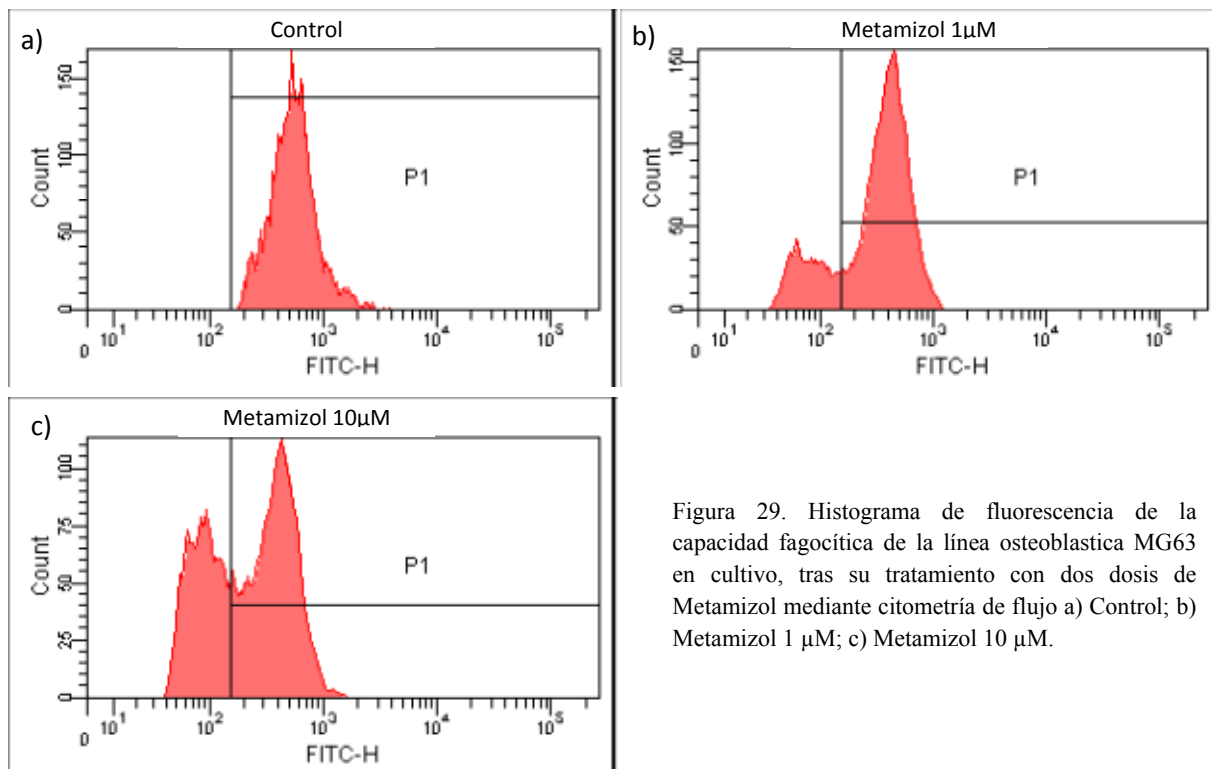


Figura 29. Histograma de fluorescencia de la capacidad fagocítica de la línea osteoblástica MG63 en cultivo, tras su tratamiento con dos dosis de Metamizol mediante citometría de flujo a) Control; b) Metamizol 1  $\mu$ M; c) Metamizol 10  $\mu$ M.

La Aspirina como podemos observar en la tabla 28 y en la Fig. 30, a dosis bajas de 1  $\mu$ M, no mostró efecto sobre la capacidad fagocítica del osteoblasto, mientras que su tratamiento con dosis más elevadas, de 10 y 20  $\mu$ M mostró un efecto inhibitorio de la actividad fagocítica, al igual que los restantes AINEs estudiados.

**Tabla 28. Porcentaje de células con capacidad fagocítica determinado mediante citometría de flujo, tratadas con Aspirina (1, 10 y 20  $\mu$ M).**

Tratamiento	Porcentaje de Células Fagocitadas (Valor Medio)	SD <sup>a</sup>	Valor P	I.C. <sup>b</sup> 95%
Control	98.89	1.5217		
Aspirina 1 $\mu$ M	96.29	1.7235	0.035	0.2289 ; 4.9710
Aspirina 10 $\mu$ M	88.47	1.9612	<b>0.000*</b>	7.8560 ; 12.9759
Aspirina 20 $\mu$ M	75.66	2.2723	<b>0.000*</b>	19.9944 ; 26.4522

<sup>a</sup> Desviación Estándar; <sup>b</sup> Intervalo de Confianza; \* Diferencias significativas.

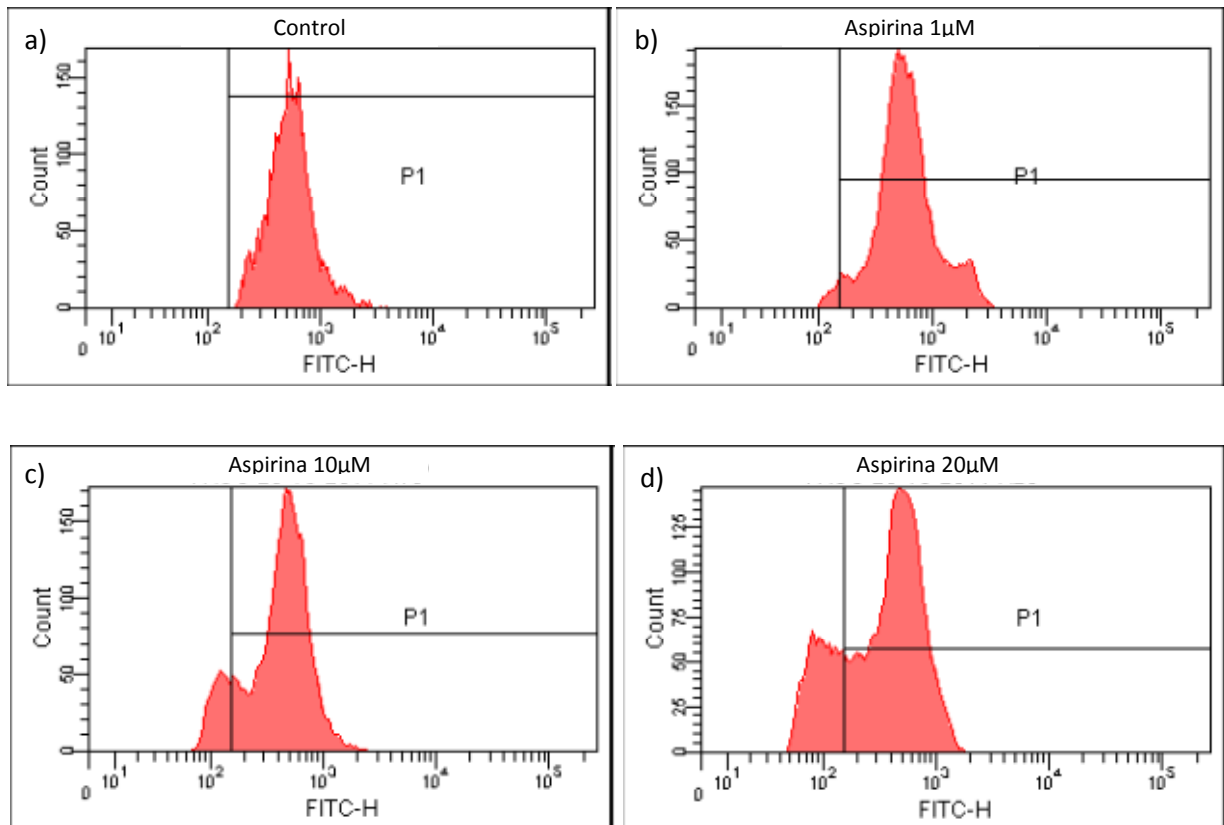


Figura 30. Histograma de fluorescencia de la capacidad fagocítica de la línea osteoblástica MG63 en cultivo, tras su tratamiento con tres dosis de Aspirina mediante citometría de flujo a) Control; b) Aspirina 1  $\mu$ M; c) Aspirina 10  $\mu$ M; d) Aspirina 20  $\mu$ M.

## **DISCUSIÓN**



Los AINEs son fármacos de uso terapéutico común, utilizados para aliviar el dolor y la inflamación. Su mecanismo de acción es mediante la inhibición de la síntesis de los metabolitos de la enzima COX, como la PGE<sub>2</sub>, al actuar sobre dicha enzima (Smith y col. 2000).

Distintos autores han demostrado un efecto adverso de los AINEs sobre el osteoblasto, que se traduce en una inhibición de su crecimiento (García-Martínez y col., 2011; Evans y Butcher, 2004). Este efecto ha sido atribuido a la inhibición de la síntesis de PGs, las cuales actúan como factores de crecimiento de esta población celular (Salari y Abdollahi, 2009). No obstante, hay cierta controversia en relación con el efecto adverso de los AINEs sobre los osteoblastos (Chang y col., 2009; Abukawa y col., 2009). Si bien, es justificada por algunos autores como consecuencia de las diferencias entre el planteamiento de los estudios analizados, ya que utilizan diferentes dosis, distintos periodos de tratamientos e incluso especies de estudio diferentes, por lo que todos estos factores podrían contribuir a que los resultados obtenidos en los distintos estudios sean diferentes e incluso contradictorios (Salari y Abdollahi 2009; Arpornmaeklong y col., 2008).

Los AINEs y el tejido óseo en reparación están estrechamente relacionados, ya que son fármacos que suelen ser administrados en situaciones como traumatismos óseos y en las intervenciones quirúrgicas que afectan al hueso como en la resección ósea o en la colocación de implantes, para paliar el dolor postquirúrgico y reducir la inflamación (Conaghan, 2011). Esta estrecha relación es la que justifica la necesidad de estudiar el efecto de estos fármacos sobre el hueso.

En la presente tesis hemos centrado nuestro estudio en valorar el efecto de cuatro AINEs: Dexketoprofeno, Ketorolaco, Metamizol y Aspirina, sobre distintos parámetros

celulares que juegan un papel importante en el proceso de formación y reparación ósea. El criterio seguido para la elección de estos cuatro AINEs se ha basado, bien en que son frecuentemente prescritos en la práctica clínica, en situaciones en las que se requiere una rápida regeneración del hueso para acelerar la rehabilitación o un rápido crecimiento y adhesión del tejido óseo al material protésico en terapias reparadoras para garantizar la oseointegración, o bien en que no han sido estudiados o su estudio ha sido poco desarrollado en este sentido.

La dosis de tratamiento utilizada ha variado según el ensayo realizado, no obstante, en todos los estudios se han utilizado la dosis de 1 y 10  $\mu\text{M}$  para todos los AINEs. Estas dosis se encuentran, en todos los casos, dentro del rango terapéutico utilizado en la práctica clínica, como se demuestra en los estudios de farmacocinética y farmacodinamia realizados para estos fármacos (Chang y col., 2009; Bae y col., 2008; Hinz y col., 2007; Barbanoj, 2006; Buckley y Brogden, 1990). Dosis más elevadas (20, 100 y 1000  $\mu\text{M}$ ) también fueron utilizadas para el estudio de parámetros concretos en relación con el crecimiento celular: proliferación, ciclo celular e inducción de apoptosis. La dosis de 20  $\mu\text{M}$  fue estudiada sólo en el caso de la Aspirina, dado que en el ensayo de proliferación, es a estas dosis donde se detecta efecto inhibitorio del crecimiento del osteoblasto.

El efecto de los diferentes AINEs se evaluó a corto plazo (24 h), dado que la finalidad de este estudio era conocer en qué medida la administración de antiinflamatorios puede afectar a las primeras etapas de la cicatrización ósea, tras una intervención quirúrgica que cursa con pérdida de tejido óseo o tras una fractura. Distintos estudios muestran que el efecto adverso de los AINEs sobre el hueso tiene lugar en las primeras etapas del proceso de curación y que la magnitud del efecto está relacionada con la duración del tratamiento (Voulteenahe y col., 2007). Por tanto, el posible efecto de

Dexketoprofeno, Ketorolaco, Metamizol o Aspirina podría tener lugar en los primeros días subsiguientes a la fractura o técnica quirúrgica, coincidiendo con el momento en el que éstos fármacos son administrados a los pacientes, para disminuir la inflamación postraumática o postoperatoria y el dolor.

Para demostrar nuestra hipótesis de estudio hemos utilizado como modelo de osteoblasto la línea celular tipificada de osteosarcoma humano MG63. Esta línea celular es considerada una línea precursora de osteoblastos por lo que posee características comunes con ellos. Esto justifica que dicha línea celular sea comúnmente utilizada como modelo de osteoblasto en el estudio del efecto de distintos tratamientos, tanto farmacológicos (Zhao y col., 2011; Prouillet y col., 2004; Rezzonico y col., 2002), como no farmacológicos (Wang y col., 2011; Rosales y col. 2010; Martini y col., 2006). Por otra parte, el uso de una línea celular tumoral presenta múltiples ventajas respecto al uso de líneas celulares establecidas por cultivo primario a partir de muestras de tejido óseo, ya que con ella se garantiza pureza celular, capacidad proliferativa ilimitada y alta homogeneidad de resultados.

En general, los resultados obtenidos en este estudio apoyan la hipótesis de que ciertos antiinflamatorios pueden afectar a distintos parámetros celulares de la línea celular MG63, los cuales juegan un papel importante en los procesos de reparación ósea, como son el crecimiento celular, la diferenciación celular o la adhesión celular.

## 1. Efecto de los AINEs sobre el crecimiento celular.

Los AINEs objeto de nuestro estudio han mostrado efecto sobre el crecimiento de la línea celular MG63 dependiendo de la dosis utilizada. Este parámetro se ha analizado desde distintas vertientes, valorándose tanto el efecto sobre la proliferación, como sobre el ciclo celular o la inducción de apoptosis.

El efecto sobre la proliferación se determinó mediante una técnica que mide respiración celular, la cual está en relación con el número de células vivas presentes y por ello es comúnmente utilizada en estudios que determinan proliferación celular (Agis y col., 2010; Walter y col., 2010). Hemos de señalar que esta técnica se ha utilizado a modo de *screening*, por lo que en ella se han ensayado un amplio margen de dosis para los distintos AINEs (0,1, 1, 5, 10, 20, 100 y 1000  $\mu\text{M}$ ), permitiéndonos definir las dosis efectivas para los posteriores estudios.

Nuestros resultados han mostrado que la capacidad proliferativa de la línea MG63 fue inhibida después de 24 horas de tratamiento en función de la dosis y del AINE administrado. Así, las diferentes dosis de Dexketoprofeno y Ketorolaco analizadas (0.1, 1, 5, 10, 100 y 1000  $\mu\text{M}$ ) mostraron un efecto inhibitorio significativo de la capacidad proliferativa; sin embargo, el tratamiento con Metamizol ejerció un efecto adverso sobre el crecimiento de la línea MG63 a partir de la dosis 10  $\mu\text{M}$ ; mientras que en el tratamiento con Aspirina, solo detectamos efecto adverso sobre la proliferación a partir de la dosis de 20  $\mu\text{M}$ .

Estos resultados corroboran los datos mostrados por Müller y col. (2011), que demuestran que la dosis de los AINEs es un factor decisivo a la hora de valorar el efecto de estos fármacos sobre la proliferación del osteoblasto, así como, su efecto sobre otros parámetros como la diferenciación celular y la migración.

El tratamiento de los osteoblastos con Dexketoprofeno disminuyó el número de células viables después de 24 h de cultivo. Aunque el efecto se mostró dosis-dependiente, hemos de resaltar que no hay una diferencia importante del porcentaje de células viables en relación con la dosis administrada.

Dexketoprofeno es el enantiómero activo del compuesto racémico (Ketoprofeno). Tanto Dexketoprofeno como Ketoprofeno son considerados fármacos de elección en el tratamiento del dolor (Conaghan, 2011; Rodríguez y col., 2003). Sin embargo, no tenemos conocimiento de que haya estudios que valoren el efecto del enantiómero activo sobre el tejido óseo. Los estudios encontrados solo entran a valorar y estudiar el efecto del Ketoprofeno sobre las células óseas en animales de experimentación.

Martins y col., (2005) estudian el efecto del Ketoprofeno sobre el proceso de reparación ósea en tibia de rata mediante el análisis digital de la densidad óptica. Previo al estudio, los animales de experimentación son sometidos a una intervención quirúrgica en la que se produce una perforación de la tibia, tanto en el grupo control como en el grupo tratado (administración de Ketoprofeno). Estos autores concluyen, en base a los resultados obtenidos, que éste fármaco afecta negativamente al proceso de reparación ósea cuando se administra durante un periodo prolongado superior a los 21 días, observando un incremento de la densidad óptica durante la primera semana del estudio y un enlentecimiento en la formación de hueso nuevo después de 21 días. Un estudio posterior también realizado en ratas, muestra que el tratamiento a corto plazo (14-21 días) con Ketoprofeno no interfiere con el proceso de reparación ósea en la tibia de los animales estudiados (Matsumoto y col., 2008). Estos estudios sugieren que el efecto de Ketoprofeno sobre el hueso es un efecto detectable a largo plazo *in vivo*.

En relación con el efecto observado en el tratamiento con Ketorolaco, nuestros datos muestran un efecto inhibitorio de la capacidad proliferativa del osteoblasto dosis dependiente, que disminuye de forma importante el porcentaje de células viables a dosis elevadas. Estos datos explicarían los resultados mostrados en los diferentes estudios llevados a cabo en animales de experimentación, en los que se observa que el tratamiento con Ketorolaco provoca una inhibición de la reparación y el remodelado óseo, suprimiendo la reparación ósea del hueso fracturado e inhibiendo la remodelación de hueso intacto (Ho y col., 1995; Buckley y Brogden, 1990). De igual modo, estarían en consonancia con otros estudios realizados sobre cultivos celulares con osteoblastos obtenidos de calvaria de rata (Chang y col., 2005; Evans y col. 2004) o con osteoblastos humanos obtenidos por cultivo primario (Chang y col, 2009), en este último estudio, incluso se utilizaron las mismas dosis de tratamiento ( $10^{-4}$  y  $10^{-5}$   $\mu\text{M}$ ).

El tratamiento con Metamizol mostró un ligero efecto sobre la capacidad proliferativa del osteoblasto a dosis terapéuticas. Solo a partir de la dosis de 10  $\mu\text{M}$  se observa un ligero descenso del número de células viables respecto del grupo control. Es precisamente a las dosis de 100 y 1000  $\mu\text{M}$ , en donde se detecta un mayor efecto sobre la proliferación celular, pero hemos de tener presente que estas dosis están muy por encima de las dosis utilizadas en clínica. El Metamizol es un fármaco indicado en el tratamiento del dolor agudo, por lo que es ampliamente utilizado en la práctica clínica en asociación con otros AINEs (Hinz y col., 2007); sin embargo, desconocemos la existencia de otros estudios que hayan valorado su efecto sobre el tejido óseo.

Desde un punto de vista clínico, hay que señalar, que para la Aspirina, el rango terapéutico más utilizado farmacológicamente hablando, está comprendido entre 0.5 y 5  $\mu\text{M}$  (Bae y col., 2008), aspecto éste de especial interés, ya que permite descartar un efecto

adverso de este AINE sobre el hueso a las dosis comúnmente utilizadas en clínica. Sólo dosis superiores a 10  $\mu\text{M}$  actuaron disminuyendo la capacidad proliferativa del osteoblasto *in vitro*. Otros estudios describen igualmente que dosis bajas de Aspirina no poseen efecto adverso sobre el tejido óseo en ratones (Coe y col., 2011), lo que estaría en consonancia con los resultados aquí mostrados.

El ciclo celular regula la división de la célula y por tanto está directamente implicado en el proceso de proliferación, por ello una alteración de la proliferación puede deberse a un cambio a nivel del ciclo celular.

Las 5 fases del ciclo celular ( $G_0$ ,  $G_1$ , S,  $G_2$  y M) pueden durar desde 12 h hasta meses o años. Mientras que la mitosis tiene una duración de 1 h, las células pueden permanecer detenidas en fase  $G_0$ . Este proceso está estrictamente regulado mediante distintas proteínas reguladoras que controlan la entrada y la progresión de las células a lo largo de las fases del ciclo (Ivanchuk y Rutka, 2004).

Entre las moléculas reguladoras del ciclo celular se encuentran:

- *Proteín-quinasas dependientes de ciclinas* (CDKs), las cuales fosforilan elementos claves en la progresión del ciclo.
- *Ciclinas*, proteínas que se unen a las CDKs y controlan su capacidad de fosforilación.
- *Inhibidores de las CDKs* (CKIs). Entre las proteínas CKIs mejor conocidas se encuentran la  $p21^{\text{waf1}}$  y  $p27^{\text{kip1}}$

- *Proteína de retinoblastoma* (pRb) y *factor de transcripción E2F* (ambas proteínas forman un complejo pero cuando pRb es fosforilada por CDKs se libera E2F que induce el paso de G<sub>1</sub> a S).
- *Factor de maduración o promoción* (MPF), es proteína quinasa que interviene en la transición de G<sub>2</sub> a M.
- *Complejo promotor de la anafase* (APC) que actúa favoreciendo la progresión a la fase M.
- *Ubiquitinas y proteosomas*, proteínas que intervienen en la degradación de ciclinas y CDKIs (su efecto hace irreversible la marcha atrás del ciclo.)
- *Proteína p53* actúa activando a p21<sup>waf1</sup>, CDKI que inhibe la fosforilación de la pRb impidiendo la liberación de E2F y deteniendo por tanto el ciclo en fase G<sub>1</sub> e induciendo apoptosis.
- Otras proteínas: *factores de crecimiento* (todos son promitóticos menos TGFβ1), *proteínas de la familia Bcl-2*, moléculas involucradas en el control de la apoptosis (Bcl2 y BclxL9 son antiapoptóticas y Bax, Bim, Bid y Bak que son apoptóticas).

Las células cuentan con mecanismos de control que les permiten detener el ciclo celular ante la existencia de algún error, bien para poder ser reparado, o bien para inducir la apoptosis cuando el daño es muy extenso.

Dado que los AINEs estudiados, en función de la dosis de tratamiento, pueden inhibir la proliferación y dado que ello puede deberse a cambios a nivel del ciclo, es por lo que éste, así como la inducción de apoptosis, han sido estudiados al objeto de tener un



---

mayor conocimiento sobre el efecto que ejercen Dexketoprofeno, Ketorolaco, Metamizol y Aspirina a nivel de crecimiento del osteoblasto.

El análisis del ciclo celular de los osteoblastos humanos (línea MG63) cultivados en presencia de Dexketoprofeno y Ketorolaco muestra un aumento del porcentaje de células en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, a partir de la dosis de 10 µM, el cual es mayor en el tratamiento con Dexketoprofeno. Si bien, hay un aumento del número de células apoptóticas a partir de la dosis de 1 µM y 10 µM en el tratamiento con Ketorolaco y Dexketoprofeno respectivamente. Estos datos sugieren que el efecto adverso de estos fármacos sobre el crecimiento del osteoblasto podría ser como consecuencia de la detención del ciclo celular y/o la inducción de apoptosis.

El tratamiento con Metamizol, a ninguna de las dosis ensayadas, mostró efecto significativo sobre el ciclo celular, si bien, sí que se detectó un ligero incremento en el porcentaje de células apoptóticas a partir de la dosis de 10 µM, lo que explicaría la disminución del número de células viables como consecuencia del cultivo durante 24 h en presencia de este fármaco a las dosis de 10, 100 y 1000 µM.

Estudios llevados a cabo en diferentes poblaciones celulares no osteogénicas, describen que los antiinflamatorios pueden inhibir la proliferación por inducción de apoptosis, mediante su actuación sobre el ciclo celular y los factores pro-apoptóticos (Weinstein and Manolagas, 2000, Zhang y col., 2000). De igual modo Piroxicam, Naproxeno, Aspirina e Indometacina inhiben la proliferación y detienen el ciclo celular en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> en células de adenocarcinoma de colon, mientras que el Celecoxib en células de cáncer de colon causa detención del ciclo celular y apoptosis. Dichos efectos son correlacionados con el incremento encontrado a nivel de la expresión de CDKIs, p21<sup>waf1</sup> y p27<sup>kip1</sup>. Estos autores descartan claramente que el efecto sobre el crecimiento sea como

consecuencia de la inhibición de la síntesis de PGs, ya que la adición al medio de cultivo de PGs no modificó el efecto observado del antiinflamatorio en ausencia de las mismas (Grosch y col., 2001; Shiiff y col., 1996).

Estudios posteriores, realizados en células óseas de calvaria de rata y en osteoprogenitores, describen que dosis terapéuticas de Ketorolaco, Indometacina o Diclofenaco provocan la muerte celular de los osteoblastos mediante detención de su ciclo celular en fase  $G_0/G_1$  (Chang y col. 2007 y 2005). Estos autores sugieren que esta detención del ciclo celular puede suponer la supresión de la formación y regeneración del tejido óseo en la remodelación. Otros fármacos antiinflamatorios, tales como: Dexametasona, Celecoxib, Diclofenaco, Piroxicam e Indometacina, también ejercen supresión de la proliferación por detención el ciclo celular en fase  $G_0/G_1$  en osteoblastos humanos en cultivo (Chang y col., 2009). En este estudio se observa que los tratamientos con Dexametasona y Celecoxib, pero no en los tratamientos con los AINEs no selectivos, tienen un efecto citotóxico sobre el osteoblasto, con la inducción de apoptosis y necrosis; este último efecto solo es detectado a altas concentraciones. Estos datos les llevan a afirmar que el mecanismo por el que los AINEs causan supresión de la proliferación del osteoblasto es otro distinto, al que clásicamente se le ha atribuido a los AINEs mediante la inhibición de la síntesis de PGs (Chang y col., 2009).

De igual modo, estudios realizados, por nuestro grupo de investigación, muestran que el tratamiento durante 24 h con Indometacina o Nimesulida a dosis terapéuticas, reducen la capacidad de crecimiento del osteoblasto y de igual modo se producen cambios significativos en el ciclo celular, con un incremento del porcentaje de células en fase  $G_0/G_1$ . Sin embargo, el tratamiento con Diclofenaco afecta de forma adversa a la capacidad proliferativa del osteoblasto, pero no se detecta paralelamente una detención del ciclo

---

celular en la fase  $G_0/G_1$  (Díaz-Rodríguez y col., 2012). Asimismo, en el presente estudio el tratamiento con dosis iguales o superiores a 10  $\mu\text{M}$  de Metamizol inhiben el crecimiento de los osteoblastos humanos sin mostrar un cambio significativo a nivel del ciclo. En este sentido, hay estudios que muestran que algunos fármacos con actividad antitumoral cuando actúan sobre células de cultivos primarios detienen el ciclo celular en fase  $G_0/G_1$ ; sin embargo, cuando estos mismos fármacos ejercen su acción sobre células transformadas no siempre se observa la detención del ciclo celular, sino que la célula entra directamente en apoptosis (Rodríguez-González y col., 2004). Esto explicaría el hecho de que el Metamizol a partir de la dosis de 10  $\mu\text{M}$  no detenga el ciclo celular y que por el contrario sí se observe muerte celular por apoptosis. No obstante, García-Martínez y col. (2011) en estudios realizados en cultivos primarios de osteoblastos humanos, observan que el tratamiento con dosis terapéuticas de Ibuprofeno y de Paracetamol inhibe el crecimiento celular pero no detectan una detención del ciclo celular en fase  $G_0/G_1$ .

En relación con la Aspirina nuestros datos muestran que el efecto que ejercen las distintas dosis estudiadas de este fármaco sobre el crecimiento de la línea MG63, guarda una estrecha relación con los resultados obtenidos al analizar el efecto de éstos sobre el ciclo celular. Cabe señalar que el tratamiento de la línea MG63 con dosis de 1 y 10  $\mu\text{M}$  de Aspirina, no afectó a la proliferación, lo que explica que no detectemos cambios a nivel del ciclo celular, ni cambios a nivel de la inducción de apoptosis/necrosis. La disminución del crecimiento a dosis de 100 y 1000  $\mu\text{M}$  de Aspirina, podría ser explicada como consecuencia del incremento significativo detectado del porcentaje de células en fase  $G_0/G_1$  en relación con el grupo control. Junto a este incremento del número de células en fase  $G_0/G_1$ , la disminución del crecimiento celular a dosis de 20 y 100  $\mu\text{M}$  podría ser atribuido a la inducción de apoptosis, sin detectarse efecto necrótico alguno, tal como indican los porcentajes de células teñidas con annexina V y/o IP. Sin embargo, el

tratamiento con dosis elevadas de Aspirina (1000  $\mu\text{M}$ ) mostró no sólo un incremento de células en apoptosis sino también un incremento de células necróticas.

Recientemente, en un estudio de cohortes se pone de manifiesto la existencia de diferencias significativas en la densidad mineral ósea entre individuos expuestos a fármacos con actividad analgésica, como AINEs y opioides, e individuos no expuestos, lo que se traducía en un aumento de incidencia de fractura en los expuestos respecto a los no expuestos. Sin embargo, cuando el AINE valorado era la Aspirina no se observó este riesgo (Vestergaard y col, 2011). De igual modo, Coe y col. (2011) en animales de experimentación, observan que dosis bajas de Aspirina incrementan los marcadores de formación de hueso (osteocalcina sérica y niveles de ARNm de osteocalcina en tibia) no afectando a los marcadores de resorción del hueso, ni al volumen, ni a la densidad ósea. Por lo tanto, estos estudios *in vivo* guardan una estrecha relación con los datos obtenidos en los ensayos *in vitro* aquí mostrados.

Cabe señalar, que los estudios de detección de apoptosis realizados por citometría de flujo y los realizados por microscopía no son numéricamente coincidentes, si bien el perfil observado con ambas técnicas es equivalente, salvo en el estudio de la Aspirina. Esta ausencia de concordancia numérica es encontrada en estudios, que al igual que nosotros, emplean ambas técnicas a la hora de determinar el efecto apoptótico de derivados de la vitamina A sobre distintas líneas celulares de osteosarcoma humano (MG63, SaOS2, U2OS) (Dozza y col., 2012).

En resumen, a nivel del crecimiento del osteoblasto nuestros datos revelan un claro efecto adverso a dosis terapéuticas, tanto de Dexketoprofeno, como de Ketorolaco, efecto que puede ser atribuido a la detención del ciclo celular en fase  $G_0/G_1$ , lo que lleva a la célula a la muerte por apoptosis.

Nuestros resultados están en relación con los descritos por Chang y col. (2009), ya que en aquellos AINEs en los que se observa un efecto adverso sobre el crecimiento, se detecta paralelamente una detención del ciclo celular en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, salvo en el caso del Metamizol. De igual modo a altas dosis encontramos, para los cuatro AINEs, tanto apoptosis como necrosis.

Por otra parte, nuestro estudio pone de manifiesto que los AINEs: Dexketoprofeno, Ketorolaco, Metamizol y Aspirina a dosis elevadas, muy por encima de la dosis terapéutica, ejercen un efecto adverso sobre los osteoblastos, el cual se traduce en una acción citotóxica directa por necrosis. Efecto ya descrito en osteoblastos humanos en cultivo al ser tratados durante 24 h con dosis elevadas de Celecoxib y Dexametasona (Chang y col., 2009). Estos resultados, sugieren que la sobredosis de estos fármacos, podría suponer, a nivel clínico, no solo la muerte del osteoblasto sino una situación inflamatoria como consecuencia de dicha necrosis.

## **2. Efecto de los AINEs sobre la diferenciación celular de línea MG63.**

Los osteoblastos derivan de células madres mesenquimatosas pluripotenciales que se diferencian hasta osteoblastos, gracias a distintos factores de transcripción específicos del linaje osteoblástico. Uno de los más importantes está representado por Cbfa1, el cual juega un papel clave en la diferenciación del osteoblasto (Ducy y col., 2000).

El crecimiento y diferenciación del osteoblasto es controlado tanto por factores locales como por factores sistémicos, como son las proteínas morfogenéticas del hueso, distintos factores de crecimiento (FGF, IGF, TGF), hormonas, citoquinas e incluso fuerzas mecánicas, las cuales a su vez pueden regular la actividad de los factores de transcripción específicos. Estos factores pueden mostrar efectos diferentes e incluso opuestos sobre la

modulación del metabolismo celular, dependiendo de la maduración y fenotipo de la célula (Komori, 2010).

El proceso de diferenciación del linaje osteoblástico, que va desde célula inmadura proliferante a célula osteoblástica madura, capaz de sintetizar proteínas óseas específicas, es un proceso complejo que se caracteriza por la expresión secuencial y definida de genes específicos del tejido, que permiten identificar tres periodos distintos del desarrollo del fenotipo del osteoblasto: fase proliferativa, fase de maduración y síntesis de la matriz extracelular y finalmente, fase de mineralización de la matriz. Durante la fase de proliferación activa, los preosteoblastos expresan los genes que soportan la proliferación y distintos genes que codifican proteínas de la matriz extracelular, como colágeno tipo I y fibronectina. La acumulación de proteínas de la matriz contribuye en parte, al cese de la proliferación celular. La segunda fase se caracteriza por la expresión de genes específicos del fenotipo del osteoblasto diferenciado, como son los genes que codifican la AP y la osteocalcina, con una síntesis elevada de AP. En la última fase la matriz extracelular progresa a la mineralización, en la que el osteoblasto sintetiza proteínas asociadas con la mineralización de la matriz, como sialoproteína, osteopontina y osteocalcina. La osteocalcina es un marcador de maduración del osteoblasto, su expresión comienza en el osteoblasto en la fase post-proliferativa, pero es máxima en la fase de mineralización (Papachroni y col., 2009).

Múltiples factores exógenos, tanto de naturaleza farmacológica y/o biológica (Ing y Belury, 2011; Bufan y col., 2009) como de otra naturaleza (Nogueira y col., 2011; Vandrovцова y Bacakova, 2010; De Oliveira y col., 2007) pueden modular el proceso de diferenciación o maduración del osteoblasto.

Distintos estudios han descrito que el efecto de los AINEs sobre el osteoblasto no se limita a la inhibición del crecimiento, sino que incluso afecta a otros parámetros celulares como la diferenciación celular. Ho y col., (1999) muestran que el tratamiento con Ketorolaco, de los osteoblastos en cultivo procedentes de calvaria de rata, con dosis de 0.1, 1, 10, 100  $\mu\text{M}$  durante 10 días, aumenta de manera dosis dependiente, tanto la actividad fosfatasa alcalina intracelular como los niveles intracelulares de colágeno tipo I en el grupo tratado con respecto al grupo no tratado. Sin embargo, la dosis de 1000  $\mu\text{M}$  y tratamientos más prolongados (15 o 20 días) no mostraron modificación de la actividad fosfatasa alcalina intracelular, mientras que a nivel de la síntesis de colágeno la dosis que mostró un mayor efecto sobre este parámetro fue la de 10  $\mu\text{M}$  y durante un periodo de 10 días de tratamiento.

Recientemente, Nogueira y col., (2011) han descrito que la irradiación, con un láser de baja intensidad, de cultivos de calvaria de rata de la línea OSTE0-1, que contienen esteroides en el medio de cultivo, produce inhibición del crecimiento. Sin embargo, cuando valoran el efecto sobre la diferenciación mediante la cuantificación de la actividad fosfatasa alcalina, ésta fue mayor en el grupo irradiado y tratado con esteroides, por lo que deducen que tanto la acción física (láser) como la acción química (esteroides) inducen la diferenciación y maduración del osteoblasto.

En relación con nuestros resultados, hemos observamos que el tratamiento de las células osteoblásticas con Dexketoprofeno, Ketorolaco, Metamizol y Aspirina, a dosis terapéuticas, producen un efecto inhibitorio del proceso de diferenciación, como lo indica la inhibición de la mineralización de la línea MG63 en medio osteogénico en presencia de estos AINEs o la inhibición de la síntesis de fosfatasa alcalina. Estos resultados están en relación con los resultados obtenidos por Díaz-Rodríguez y col. (2010), dichos autores

muestran que el tratamiento de la línea MG63 con Paracetamol (25  $\mu\text{M}$ ) durante 24 h disminuye significativamente la concentración de osteocalcina en el sobrenadante de cultivo.

Las células dendríticas y los osteoblastos son poblaciones celulares que han sido relacionadas, ya que comparten la expresión de distintos antígenos de membrana y algunas capacidades funcionales, como la fagocitosis o la estimulación alogénica de células T (Ruiz y col., 2003). En este sentido el tratamiento *in vitro* con altas dosis de Aspirina (2mM) de células dendríticas en cultivo produce un efecto sobre la diferenciación, maduración y función de las células dendríticas. Este efecto se traduce en una detención de la diferenciación y maduración de estas células (Bufan y col., 2009), lo que estaría en consonancia con los resultados aquí mostrados.

Nuestros datos y los mostrados por otros estudios nos sugieren que algunos AINEs pueden detener el proceso de diferenciación del osteoblasto, lo que unido a su efecto inhibitorio del crecimiento explicaría ampliamente el efecto adverso de estos fármacos sobre la formación y remodelación del hueso.

### **3. Efecto de los AINEs sobre la adhesividad celular.**

El proceso de adhesión celular, ya sea intercelular o con los componentes de la matriz extracelular, juegan un importante papel en los seres vivos. La embriogénesis, la remodelación, cicatrización y la migración celular dependen de la expresión de moléculas de membrana que permitan y faciliten la adhesión celular de una manera reversible y selectiva (Mousa, 2008; Sánchez-Madrid, 2003).



Las moléculas de adhesión son por tanto receptores funcionales que se expresan en la membrana celular y participan activamente en fenómenos fisiológicos y patológicos. Su principal característica es la capacidad de transducir señales al interior de las células al interactuar con sus ligandos desencadenando distintos cambios funcionales como expresión génica, cambios fenotípicos, inducción o sobreexpresión de determinadas moléculas en la membrana celular y por tanto cambios en el estado de activación celular. Estas moléculas se clasifican en familias y superfamilias, como las selectinas, integrinas, inmunoglobulinas, mucinas o cadherinas, entre otras (Mousa, 2008; Sánchez-Madrid, 2003).

En el osteoblasto, al igual que en otras células, la adhesión celular y la migración desempeñan un importante papel, el cual adquiere una mayor relevancia en la etapa de reparación ósea. Esto justifica la importancia de estudiar el efecto de los AINEs no sólo sobre el crecimiento del osteoblasto, sino también sobre otros parámetros como la adhesión o la migración celular.

Distintos estudios han revelado que ciertos AINEs como Indometacina o Diclofenaco aumentan la adhesión celular y disminuyen la migración de distintas poblaciones celulares, aspectos éstos de relevancia clínica en el tratamiento de procesos tumorales, en el control de la inflamación y el dolor en enfermedades autoinmunes (Axelsson y col., 2010; Villalonga y col., 2010; Martínez y col., 2005). De igual modo, nuestros resultados muestran que Dexketoprofeno, Ketorolaco y Metamizol, especialmente a la dosis de 10  $\mu$ M, aumentan significativamente la adhesividad de la línea celular MG63. Efecto que solo puede ser detectado en las primeras horas del tratamiento. Sin embargo, la Aspirina en ninguna de las dosis estudiadas (1, 10 y 20  $\mu$ M) mostró efecto significativo sobre la adhesión de la línea de osteosarcoma humano MG63.

El que una sustancia mejore la capacidad de adhesión del osteoblasto puede suponer un beneficio desde un punto de vista clínico, ya que en la terapia mediante implantes o en la regeneración del hueso fracturado, junto al crecimiento del osteoblasto, para favorecer la formación de callo óseo, es también necesaria una adhesión célula-célula y célula-superficie que permita y favorezca la formación del callo óseo y el proceso de oseointegración (Wu y col., 2011; Dubey y col., 2010). En dichas terapias regeneradoras y/o reparadoras, es común administrar AINEs, por su acción analgésica y antiinflamatoria, por lo que el hecho de que estos fármacos puedan actuar mejorando el proceso de adhesión celular se considera un efecto beneficioso.

#### **4. Efecto de los AINEs sobre el fenotipo.**

Los osteoblastos expresan una serie de antígenos de superficie que son modulables, los cuales están en relación con el grado de diferenciación y/o activación celular y son los siguientes: antígeno CD54, CD80, CD86 y HLA-DR (Reyes-Botella y col., 2000, Reyes-Botella y col., 2002; Ruiz y col., 2003; Pérez y col., 2006, Díaz-Rodríguez y col., 2009). Estudios previos de nuestro grupo de investigación, realizados igualmente en la línea MG63, han mostrado que AINEs como Indometacina, Nimesulida, Diclofenaco y Paracetamol pueden modular algunos de estos marcadores, observándose en general un incremento en la expresión de los mismos, el cual es atribuido a una activación celular (Díaz-Rodríguez y col., 2010 y Díaz-Rodríguez y col., 2012). Sin embargo, cuando se trataron osteoblastos procedentes de cultivos primarios con Ibuprofeno o con Paracetamol no se detectó un cambio significativo en la expresión de estos marcadores (García-Martínez y col., 2011), lo que podría ser explicado por el diferente estado de maduración celular de ambas poblaciones, ya que la línea MG63 es un osteoblasto inmaduro y la

---

expresión de estos marcadores podría estar en relación con el grado de activación y/o maduración del osteoblasto, tal y como ocurre en las células dendríticas (Bancheraeu y col., 2000; Cella y col., 1997), con las que el osteoblasto guarda relación antigénica, morfológica y funcional (Ruiz y col., 2003).

Nuestros resultados muestran que como consecuencia del tratamiento durante 24 h con los distintos AINEs estudiados hay un incremento en el porcentaje de expresión de la molécula CD54. Dicho marcador se expresa en alto porcentaje en el preosteoblasto y en el osteoblasto inmaduro (Lisignoli y col 2004). En relación con los restantes marcadores observamos una ligera o nula modulación del perfil antigénico como consecuencia del tratamiento. Así, el Dexketoprofeno a la dosis de 1  $\mu$ M disminuye la expresión del D80 y CD86, el Ketorolaco, a la dosis de 10  $\mu$ M, sólo disminuye la expresión de CD86 y por su parte la Aspirina sólo modula el CD86 a la dosis de 20  $\mu$ M. Sólo el cultivo en presencia de Metamizol fue el que produjo una modulación de los tres marcadores CD80, CD86 y HLA-DR a las dos dosis estudiadas.

Las células dendríticas maduras (mCDs) son potentes células presentadoras de antígenos, pero las CDs inmaduras (iCDs) tienen reducida esta capacidad. Estudios realizados, en CDs humanas y en CDs murinas estimuladas con lipopolisacarido (LPS) al ser tratadas con Aspirina reducen la expresión de CD1a, CD40, CD80, CD86 y moléculas HLA de clase II (HLA-DR). El tratamiento, también produce una disminución de la concentración de IL-12 e IL-10 y un aumento de TNF $\alpha$ . El efecto mostrado a nivel de la síntesis de la IL-12 y en el TNF $\alpha$  sugiere, que podría no ser debido a la inhibición de la capacidad reguladora de la ciclooxigenasa. Además, el efecto de la Aspirina sobre la maduración de las CDs es dosis dependiente (Ho y col., 2001; Hackstein y col., 2001).

Buckland y col. (2006a) muestran igualmente que el tratamiento con Aspirina de las CDs, vuelven a estas células parcialmente resistentes a los cambios fenotípicos propios de la maduración celular. El tratamiento, sin embargo, no altera la función endocítica pero reducen su capacidad de estimular a las células T alogénicas en comparación con CDs no tratadas. En este efecto, sugieren que participa tanto del contacto célula-célula como de la actividad inhibitoria de citoquinas.

Ahora bien, hay que señalar que mCDs tratadas con Aspirina mantienen, aunque a niveles más bajos, su capacidad de procesamiento y presentación del antígeno y poseen su potencial para inducir actividad reguladora en respuesta a células T. Sin embargo, cuando se tratan iCDs, estas se vuelven resistentes a los efectos de los estímulos de maduración, como lo demuestran los bajos niveles de expresión de CD40, CD80, CD83 y CD86. Las mCDs tratadas con Aspirina, expresan niveles más altos de moléculas coestimuladoras de células T, menor cantidad de IL-10 y mayor de IL-2, que las iCDs. De modo que, la exposición de células T CD4<sup>+</sup> a CDs tratadas con Aspirina, producen niveles significativos de IFN $\gamma$  pero las células son hipoproliferativas (Buckland y col., 2006b).

Bufan y col. (2008) muestran que las iCDs tratadas con Aspirina disminuyen la expresión de CD80 HLA-DR y aumenta ligeramente la expresión de CD54. Estos resultados guardan relación con los obtenidos en nuestro estudio donde el tratamiento con cualquiera de los AINEs ensayados aumenta la expresión de CD54 y disminuye en algunos de los casos la expresión de las moléculas coestimuladora.

Los resultados de modulación del perfil antigénico, junto con los obtenidos en el estudio del efecto sobre la diferenciación nos sugieren que el aumento en la expresión de CD54 y el descenso en la expresión de los restantes marcadores, podría responder a un efecto inhibitor de la diferenciación o maduración del osteoblasto.

## **5. Efecto de los AINEs sobre la capacidad fagocítica.**

Los osteoblastos son células que muestran capacidad fagocítica frente a distintas partículas dianas. Esta capacidad se detecta en un alto porcentaje de células de la línea celular MG63, mientras que en cultivos primarios de osteoblastos humanos obtenidos a partir de muestras de hueso, sólo en un 30 % se observó dicha capacidad (Ruiz y col., 2003; Díaz-Rodríguez y col., 2009), lo que creemos que guarda relación con el grado de maduración celular.

Nuestros resultados muestran un descenso de la capacidad fagocítica de la línea MG63, como consecuencia del tratamiento con los cuatro AINEs ensayados. Por otra parte, los ensayos realizados para determinar el efecto de Dexketoprofeno, Ketorolaco, Metamizol y Aspirina sobre la diferenciación sugieren un efecto adverso sobre la misma, con inhibición del proceso de mineralización de estas células en medio osteogénico, inhibición a nivel de la actividad fosfatasa alcalina y ausencia de cambios a nivel de la síntesis de colágeno, lo que desconocemos si este efecto podría explicar el descenso en el porcentaje de células fagocíticas al ser tratadas.

Los osteoblastos cultivados en presencia de Paracetamol, Indometacina, Nimesulida y Diclofenaco disminuyen su capacidad fagocítica, de manera equivalente a como lo hacen Dexketoprofeno, Ketorolaco, Metamizol y Aspirina. Si bien, en los primeros no es atribuido a una inhibición de la maduración (Díaz-Rodríguez y col. 2010 y Díaz-Rodríguez y col., 2012).

El presente estudio creemos que puede suponer una herramienta útil en manos del clínico; en el tratamiento del hueso en reparación, al disponer de información que le permita, según un criterio científico, seleccionar aquellos AINEs que carezcan o sólo posean ligeros efectos adversos sobre el osteoblasto.

Por otra parte, el reciente avance en terapias regenerativas tisulares ha puesto en manos del clínico distintas alternativas que actúan estimulando el crecimiento de las células de los tejidos en reparación. Entre las que se encuentra el hueso, bien mediante la aplicación local de factores de crecimiento como el plasma rico en plaquetas (PRP), que presenta la ventaja de liberar factores de crecimiento de carácter autólogo (García-Martínez y col., 2011); o bien aplicando técnicas físicas que producen bioestimulación, como las ondas de choque (Martini y col., 2003) o la terapia mediante el láser de baja intensidad (Jakse y col., 2007). Estas terapias innovadoras suelen generalmente ir asociadas al tratamiento con AINEs, de ahí la importancia de conocer en profundidad el efecto de estos fármacos sobre los procesos de crecimiento y adhesión de las células implicadas en la formación y reparación del hueso, descartando aquellos que muestran efectos adversos a este nivel.

## **CONCLUSIONS**

1.- At therapeutic doses (0.1-10 mM) Dexketoprofen and Ketorolac show an adverse effect on the MG63 line growth by inhibiting the proliferative capacity by arrest of the cell cycle in G0/G1 phase and induction of apoptosis. While, Metamizol inhibits proliferation from the dose of 10  $\mu$ M, by induction of apoptosis without cell cycle arrest. Aspirin, however, does not inhibit osteoblast growth at therapeutic doses. In those situations require rapid regeneration of bone tissue, should be assessed using Ketorolac and Dexketoprofen for other NSAIDs such as Aspirin or Metamizol.

2.- Dexketoprofen, Ketorolac, Metamizol and Aspirin in high doses (100 and 1000  $\mu$ M) show a cytotoxic effect on osteoblast necrosis, so its use should be restricted to strictly therapeutic doses.

3.- Dexketoprofen, Ketorolac, Metamizol and Aspirin have an adverse effect on the differentiation and / or maturation of the osteoblast, by decreasing the synthesis of alkaline phosphatase and inhibit the mineralization of osteogenic cells in medium.

4.- The short-term treatment of the line MG63 with therapeutic doses of Dexketoprofen, Ketorolac, Metamizol and Aspirin increases the expression of CD54 and sometimes decreases the expression of antigens involved in antigen presentation (CD80, CD86 and HL-DR ), this effect is associated with an inhibition of the phagocytic capacity, which is related to the inhibition of differentiation as a result of treatment.

5.- Dexketoprofen, Ketorolac, Metamizol and Aspirin showed a favorable effect on short-term on cell adhesion. This effect is desired in all regenerative process, either because it contributes to the formation of callus or because they can help the process of osseointegration in reparative therapy through the use of prosthetic material.



1.-A dosis terapéuticas (0.1-10  $\mu\text{M}$ ) Dexketoprofeno y Ketorolaco muestran un efecto adverso sobre el crecimiento de la línea MG63, por inhibición de la capacidad proliferativa mediante detención del ciclo celular en fase  $G_0/G_1$  e inducción de apoptosis. Mientras que Metamizol inhibe la proliferación a partir de la dosis de 10  $\mu\text{M}$ , por inducción de apoptosis sin detener el ciclo celular. La aspirina, sin embargo, no inhibe el crecimiento del osteoblasto a dosis terapéuticas. En aquellas situaciones que se requiera una rápida regeneración del tejido óseo, debería valorarse el uso de Dexketoprofeno y Ketorolaco a favor de otros AINEs como Metamizol o Aspirina.

2.-Dexketoprofeno, Ketorolaco, Metamizol y Aspirina a dosis elevadas (100 y 1000  $\mu\text{M}$ ) muestran un efecto citotóxico sobre el osteoblasto por necrosis, por lo que su uso debe de estar restringido a las dosis estrictamente terapéuticas.

3.-Dexketoprofeno, Ketorolaco, Metamizol y Aspirina poseen un efecto adverso sobre la diferenciación y/o maduración del osteoblasto, al disminuir la síntesis de fosfatasa alcalina e inhibir la mineralización de las células en medio osteogénico.

4.-El tratamiento a corto plazo de la línea MG63 con dosis terapéuticas de Dexketoprofeno, Ketorolaco, Metamizol y Aspirina aumenta la expresión de CD54 y en ocasiones disminuye la expresión de los antígenos implicados en la presentación antigénica (CD80, CD86 y HL-DR), este efecto va asociado con una inhibición de la capacidad fagocítica, lo que guarda relación con la inhibición de la diferenciación como consecuencia del tratamiento.

5.-Dexketoprofeno, Ketorolaco, Metamizol y Aspirina muestran un efecto favorable a corto plazo sobre la adhesión celular. Este efecto es deseado en todo proceso regenerativo, bien porque contribuye a la formación del callo óseo o bien porque puede

favorecer el proceso de oseointegración en terapia reparadora mediante el empleo de material protésico.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Abbas AK., y Lichtman AH. (2006). *Inmunología celular y molecular*. (2ªed.). Madrid: Elsevier.
- Abukawa H., Phelps M., Jackson P., Smith RM., Vacanti JP., Kaban LB y Troulis MJ. (2009). Effect of Ibuprofen on osteoblast Differentiation of porcine bone marrow-derived progenitor cells. *J Oral Maxillofac Surg* 97:2412-2417.
- Agerbaek MO., Eriksen EF., Kragstrup J., Mosekilde L. y Melsen F. (1991). A reconstruction of the remodeling cycle in normal human cortical iliac bone. *Bone Miner.* 12:101-112.
- Agis H., Blei J., Watzek G. y Gruber R. (2010). Is zoledronate toxic to human periodontal fibroblast? *J. Dent. Res.* 89(1):40-45.
- Allen KN. (1995). Aspirin: now we can see it. *Nat med*, 1(9):882-883.
- Andrade A., Namora SF., Woisky RG., Wiesel G., Najjar R., Sertié JAA. y De Olivera Silve D. (2000). *J Inorg. Biochem*; 81:23-27.
- Aranza J., Sádaba B. y García E. (2004). Antiinflamatorios no esteroideos. En *Farmacología Clínica para profesionales de la salud*. Pamplona: Ediciones Eunate; (pp.165-174).
- Armour KJ., Van't Hof RJ., Armour KE., Torbergson AC., Del Solsato P y Ralston SH. (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.
- Arpornmaeklong P., Akarawatcharangura B. y Pripatnanot P. (2008). Factors influencing effects of specific COX-2 inhibitor NSAIDs on growth and differentiation of mouse osteoblasts on titanium surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants*; 23: 1071-1081.
- Aubin JE., Liu F., Malaval L. y Gupta AK. (1995). Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone* 17(2), 77s-83s.
- Aubin JE., Turksen K. y Hersche JNM. (1993). Osteoblastic cell Lineage. En: Noda M, ed. *Cellular and Molecular Biology of Bone*. San Diego; Academic Press Inc; 1-45.

Axelsson H., Lönnroth C., Andersson M. y Lundholm K. (2010). Mechanisms behind COX-1 and COX-2 inhibition of tumor growth in vivo. *Int J Oncol*, , 37: 1143-1152.

Bae SK., Seo KA., Jung EJ., Kim HS., Yeo CW., Shon JH., Park KM., Liu KH. y Shin JG. (2008). Determination of acetylsalicylic acid and its major metabolite, salicylic acid, in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to pharmacokinetic study of Astrix in Korean healthy volunteers. *Biomed Chromatogr*; 22(6):590-5.

Banchereau J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu YJ., Pulendran B. y Palucka K. (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*; 18:767–811.

Barbanoj MJ. (2006). Clinical pharmacokinetics of dexketoprofen trometamol: recent studies. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*; 28 Suppl A: 3-5.

Beck A., Krischak G., Sorg T., Augat P., Farker K., Merkel U., Kinzl L. y Claes L. (2003). Influence of diclofenac (group of nonsteroidal anti-inflammatory drugs) on fracture healing. *Arch Orthop Trauma Surg*; 123:327-332.

Becker WM., Kleinsmith LJ., Hardin J. y Bertoni GP. (2009). *The World of the Cell (17th edition)*. Pearson Education, Inc.)

Boivin G., Anthoine-Terrier y Obrant KJ. (1990). Transmission electron microscopy of bone tissue. A review. *Acta Orthop Scand*, 61(2): 170-180.

Bonewald L. (2006). Osteocytes as multifunctional cells. *J Musculoskelet Neuronal Interact*; 6:331-333.

Bost KL., Bento JL., Ellington JK., Marriott I. y Hudson MC. (2000). Induction of colony stimulating factor expression following Staphylococcus or Salmonella interaction with mouse or human osteoblasts. *Infect Immun*; 68:5075–83.

Bost KL., Bento JL., Petty CC., Schrum LW., Hudson MC. y Marriott I. (2001). Monocyte chemoattractant protein-1 expression by osteoblasts following infection with Staphylococcus aureus or Salmonella. *J Interferon Cytokine Res*; 21:297–304.

Bostrom MPG., Yang X. y Koutras I. (2000). Biologics in bone healing. *Curr Op Orthop*; 11:403-412.

- Botting R. y Ayoub SS. (2005). COX-3 and the mechanism of action paracetamol/acetaminophen. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 72:85-87.
- Boursino LA., Karachalios T., Poultides L. y Malizos KN. (2009). Do steroids, conventional non-steroidal anti-inflammatory drugs and selective Cox-2 inhibitors adversely affect fracture healing? *J Musculoskelet Neuronal Internact*, 9(1):44-52.
- Boutaud O., Aroffo DM., Richardson JH., Marnett LJ. y Oates JA. (2002). Determinants of the cellular specificity of acetaminophen as an inhibitor of prostaglandin H(2) synthases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(10):7130-7135.
- Bouvert-Gerbettaz S., Merigo E., Rocca JP., Carle GF. y Rochet N. (2009). Effects of Low-level Laser Therapy on proliferation and differentiation of murine bone marrow cells into osteoblasts and osteoclasts. *Laser in Surgery and Medicina* 41: 291-297.
- Brandi ML. (2009). Microarchitecture, the key to bone quality. *Rheumatology (Oxford)*; 48 Suppl 4: iv3-iv8.
- Brown KM., Saunders MM., Kirsch T., Donahue HJ. y Reid JS. (2004). Effects of COX-2-specific inhibition on fracture healing in the rat femur. *J Bone Joint Surg Am*; 86A:116-123.
- Buckland M., Jago C., Fazekasova H., George A., Lechler R. y Lombardi G. (2006a). Aspirin modified dendritic cells are potent inducers of allo-specific regulatory T-cells. *Int Immunopharmacol.*; 20;6(13-14):1895-1901.
- Buckland M., Jago CB., Fazekasova H., Scott K., Tan PH., George AJ., Lechler R. y Lombardi G. (2006 b). Aspirin-treated human DCs up-regulate ILT-3 and induce hyporesponsiveness and regulatory activity in responder T cells. *Am J Transplant*; 6(9):2046-2059.
- Buckley MM., y Brogden RN. (1990). Ketorolac. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential. *Drugs*; 39:86-109.
- Buckwalter JA. y Cooper RR. (1987). Bone structure and function. *Instr Course Lect*, 36: 27-48.

Bufan B., Mojsilovic S., Vucicevic D., Vucevic D., Vasilijic S., Balint B. y Colic M. (2009) Comparative effects of aspirin and NO-releasing aspirins on differentiation, maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells in vitro. *International Immunopharmacology*; 9:910-917.

Caetano-Lopes J., Canhao H. y Fonseca JE. (2007). Osteoblasts and bone formation. *Acta Reum Port*; 32:103-110.

Capone MI., Tacconelli S., Di Francesco L., Sacchetti A., Sciull MG. Y Patrignani P. (2007). Pharmacodynamic of cyclooxygenase inhibitor of humans. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*; 82(1-4):85-94.

Cardoso L., Herman BC., Verborgt O., Laudier D., Majeska RJ. y Schaffler MB. (2009) Osteocyte apoptosis controls activation of intracortical resorption in response to bone fatigue. *J Bone Miner Res*; 24:597-605.

Cella M., Sallusto F. y Lanzavecchia A. (1997) Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol*; 9:10-6.

Chandrasekharan NV., Dai H., Roos LT., Evanson K., Tomsik J., Elton TS. y Simmons DL. (2002). COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure and expression. *Proc Nat Acad Sci* 99:13926-13931.

Chang JK., Li C J., Liao HJ., Wang CK., Wang GJ. y Ho ML. (2009). Anti-inflammatory drugs suppress proliferation and induce apoptosis through altering expression of cell cycle regulators and pro-apoptotic factors in cultures human osteoblasts. *Toxicology*; 258:148-156.

Chang JK., Li CJ., Wu SC., Yeh CH., Chen CH., Fu YC., Wang GJ. y Ho ML. (2007). Effects of anti-inflammatory drugs on proliferation, cytotoxicity and osteogenesis in bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochemical Pharmacology*; 74:1371-1382.

Chang JK., Wang GJ., Tsai ST. y Ho ML. (2005). Nonsteroidal anti-inflammatory drug effects on osteoblastic cell cycle, cytotoxicity and cell death. *Connect Tissue Res*, 46:200-10.

- Coe LM., Denison JD. y McCabe LR. (2011). Low doses aspirin therapy decreases blood glucose levels but does not prevent type I Diabetes-induced bone loss. *Cell Physiol Biochem*; 28(5):923-932.
- Conaghan PG. (2011). A turbulent decade for NSAIDs: update on current concepts of classification, epidemiology, comparative efficacy, and toxicity. *Rheumatol Int*; DOI 10.1007/s00296-011-2263-6.
- Connell L. y McInnes IB. (2006). New cytokine targets in inflammatory rheumatic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol*; 20(5):865-878.
- Conroy MC., Randinitis EJ. y Turner JL. (1991). Pharmacology, Pharmacokinetics and therapeutic use of meclofenamate sodium. *Clin J Pain.*, 7: S44-S48.
- Coulibaly MO., Sietsema DL., Burgers TA., Mason J., Williams BO. y Jones CB. (2010). Recent Advances in the Use of Serological Bone Formation Markers to Monitor Callus Development and Fracture Healing. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 20(2): 105–127.
- Chu CY., Chen YL., Lin LJ. y Sun CC. (2003). Allergic contact dermatitis from etofenamate without cross-sensitization to other anthranilic acid derivatives. *Dermatology*, 206(4):241-342.
- Cui D. (2011). *Histología con correlaciones funcionales y clínicas (1ªed.)*. Ed. Lippincott Williams y Wilkins.
- Danon A., Leibson V. y Assouline G. (1983). Effects of aspirin, indomethacin, flufenamic acid and paracetamol on prostaglandin output from rat stomach and renal papilla in vitro and ex vivo. *J Pharm Pharmacol*, 35:576-579.
- Daluisi A., Ramsey KE., Shi Y., Bostrom MP., Nestor BJ., Martin G., Hotchkiss R. y Stephan DA. (2006). Cyclooxygenase-2 inhibitors in human skeletal fracture healing. *Orthopedics* 29(3):259-261.
- De Oliveira PT., Zalzal SF., Beloti MM., Rosa AL. y Nanci A. (2007). Enhancement of in vitro osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography. *J Biomed Mater Res A*; 80: 554-564.



Díaz-Rodríguez L., García-Martínez O., Arroyo-Morales M., Rodríguez-Pérez L., Rubio-Ruiz B. y Ruiz C. (2012). Effects of indomethacin, nimesulide, and diclofenac on human MG-63 osteosarcoma cell line. *Biol Res Nurs*; 14(1):99-108

Díaz-Rodríguez L., García-Martínez O., Arroyo-Morales M., Rubio-Ruiz B. y Ruiz C. (2010). Effect of paracetamol on human MG63 osteosarcoma cellular line. *Acta Pharmacol Sin*; 31(11):1495-9.

Díaz-Rodríguez L; García-Martínez O, Arroyo-Morales M, Reyes-Botella C, Ruiz C. (2009). Antigenic phenotype and phagocytic capacity of MG-63 osteosarcoma line. *Annals of the New York Academy of Sciences*; 1173: E46-E54.

Díaz-Rubio M. y Espinós D. (1994). *Tratado de medicina interna*. (1ªed). Madrid: Médica Panamericana.

Dodds DM., Merry K., Littlewood A. y Gowen, M. (1994). Expression of mRNA for IL1 beta, IL6 and TGF beta1 in developing human bone and cartilage. *J Histochem Cytochem*; 42(6):733-744.

Dozza B., Papi A., Lucarelli E., Scotlandi K., Pierini M., Tresca G., Donati D. y Orlandi M. (2012). Cell Growth and apoptotic effect of the rexinoid 6-OH-11-O-hydroxyphenantrene on human osteosarcoma and mesenchymal stem cells. *Toxicology in Vitro*; 26:142-149.

Dubey AK., Tripathi G. y Basu B. (2010). Characterization of hydroxyapatite-perovskite (CaTiO<sub>3</sub>) composites: phase evaluation and cellular response. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*; 95: 320-329.

Ducy P., Schinke T. y Karsenty G. (2000). The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science*; 289:1501-1504.

Ducy P. y Karsenty G. (1998). Genetic control of cell differentiation in the skeleton. *Curr Opin Cell Biol.*, 10, 614-619.

Ducy P., Zhang V., Georoffroy A., Ridall L. y Karsenty G. (1997). *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 89, 747-754.

- Einhorn TA. (1996). The bone organ system: form and function. In Marcus R, Feldman D, Kelsey J. (Ed.), Osteoporosis. Pp. 3-22. San Diego.
- Eriksen EF. (2010). Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord*, 11:219-227.
- Eriksen EF., Hodgson SF., Eastell R., Cedel SL., O'Fallon WM. y Riggs BL. (1990). Cancellous bone remodeling in type I (postmenopausal) osteoporosis: Quantitative assessment of rates of formation, resorption, and bone loss at tissue and cellular levels. *J Bone Miner Res*. 5: 311-319.
- Espluges JV. Y Barrachina MD. (2008). Mediadores celulares II. Eicosanoides. Oxido nítrico y factor activador de las plaquetas. En Florez J., Armijo JA. y Madiavilla A. *Farmacología Humana*. 5ª Ed. (pp.391-406) Barcelona: Elsevier Masson.
- Etcheverry SB., Barrio DA., Cortizo AM. y Williams PAM. (2002). The new vanady (IV) with non-steroidal anti-inflammatory drugs (Ibuprofen, Naproxen and Tolmetin). Bioactivity on osteoblast-like cells in culture. *J. Inorg. Biochem*; 88:94-100.
- Evans CE. y Butcher C. (2004). The influence on human osteoblasts in vitro of nonsteroidal anti-inflammatory drugs which act on different cyclooxygenase enzymes. *The Journal of Bone & Joint Surgery (Br)*; 86, 444-449.
- Feria M. (2008). Farmacos analgésicos-antipiréticos y antiinflamatorios no esteroideos. Antiarrítmicos. En Florez J., Armijo JA. y Madiavilla A. *Farmacología Humana*. 5ª Ed. (pp.421-456) Barcelona: Masson.
- Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil I., Alobera-Gracia MA., del-Canto-Pingarron M. y Blanco-Jerez L. (2006) Physiological bases of bone regeneration II. The remodelling process. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*; 11(2): E151-157.
- Frendrick AM. y Greenberg BP. (2009). A review of the benefits and risk of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the management of mild-to-moderate-osteoarthritis. *Osteopathic Medicine and Primary Care* 3:1.
- Florez J., Armijo JA. y Madiavilla A. (2008). *Farmacología Humana* 5ª Ed. Barcelona: Elsevier Masson.

Fracon RN., Teófilo JM., Satin RB. y Lamano T. (2008). Prostaglandins and bone: potential risks and benefits related to the use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in clinical dentistry. *J. Oral Scien.* 50(3): 247-252.

Fransen M. y Neal B. (2004). Non-steroidal anti-inflammatory drugs for preventing heterotopic bone formation after hip arthroplasty. *Cochrane Database Syst Rev*; 3: CD001160.

Frost HM. (1990). Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): Redefining Wolff's law: the bone modelling problem. *Anat Rec*, 226(4), 403-413.

Frost HM. (2001). Musculoskelet. Neuronal Interact. 2 121-130.

Gallager JC. (2008). Advances in bone biology and new treatments for bone loss. *Maturitas*, 60:65-69.

García Barreno O. (2008). Inflamación. *Rev R Acad Cienc Exact Fís Nat*; 102(1); 91-159.

García-Martínez O., Reyes-Botella C., Díaz-Rodríguez L., De Luna-Bertos E, Ramos-Torrecillas J., Vallecillo-Capilla MF., Ruiz C. (2011). Effect of Platelet-rich plasma on growth and antigenic profile of human osteoblasts and its clinical impact. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*; (In press) Doi 10.1016/j.joms.2011.06.199

García-Martínez O., Díaz-Rodríguez L., Rodríguez-Pérez L., De Luna-Bertos E., Reyes-Botella C. y Ruiz C. (2011). Effect of acetaminophen, ibuprofen and methylprednisolone on different parameters of human osteoblast-like cells. *Archives of oral biology*; 56:317-323.

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

Gasper NA., Petty CC., Schrum LW., Marriott I. y Bost KL. (2002). Bacteria induced CXCL10 secretion by osteoblasts can be mediated, in part, through TLR4. *Infect Immun*; 70:4075-82.

Geneser F. (2000). *Histología* (ed.) Buenos Aires: Panoramica.

Gerstfeld LC., Al-Ghawas M., Alkhiary YM., Cullinane DM., Krall EA., Fitch J.L., Webb EG., Thiede MA. y Einhorn TA. (2007). Selective and nonselective cyclooxygenase-2 inhibitors and experimental fracture-healing. Reversibility of effects after short-term treatment. *J Bone Joint Surg Am.* 89(1): 144-125.

Gerstfeld LC., Thiede M., Seibert K., Mielke C., Phippard D., Svagr B., Cullinane D. y Einhorn TA (2003). Differential inhibition of fracture healing by non-selective and cyclooxygenase-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Orthop Res* 21:670-675.

Giannoudis PV., McDonald DA., Matthews SJ., Smith RM., Furlong AJ y De Boer P (2000). Non-union of the femoral diaphysis. The influence of reaming and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Bone Joint Surg Br;* 82(5):655-658.

Gimble JM., Robison CE., Wu X. y Kelly KA. (1996). The function of adipocytes in the bone marrow stroma: an update. *Bone;* 19(5): 421-428.

Gonzalez R., Poza P., Vives R. y Canto G. (2002). Antiinflamatorios inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa-2 (COX-2). *Alergol Inmunol Clin;* 17: 247-254.

González-Macías J. y Serrano Figueras S. (2010). Enfermedades óseas. En Farreras P y Rozman C., *Medicina Interna* (16ªed), Madrid Elsevier.

Goodman S., Ma T., Trindade M., Ikenoue T., Matsuura I., Wong N., Fox N., Genovese M., Regula D. y Smith RL. (2002). COX-2 selective NSAID decreases bone ingrowth in vivo. *J Orthop Res* 20(6):1164-9.

Goodman S., Ma T., Mitsunaga L., Miyanishi K., Genovese MC. y Smith RL. (2005). Temporal effects of a COX-2-selective NSAID on bone ingrowth. *J Biomed Mater Res A;* 72: 279-87.

Gortz B., Hayer S., Redlich K., Zwerina J., Tohidast-Akrad M., Tuerk B., Hartmann C., Lollias G., Steiner G., Smolen JS. y Schett G. (2004). Arthritis induces lymphocytic bone marrow inflammation and endosteal bone formation. *J Bone Miner Res,* 19(6): 990-8.

Graham GG., Robins SA., Bryant KJ. y Skott KF (2001). Inhibition of prostaglandin synthesis in intact cells by paracetamol (acetaminophen). *Inflammopharmacology*, 9(1-2): 131-142.

Green S., Buchbinder R., Barnsley L., Hall S., White M., Smidt N. y Assendelft WJJ. (2001). Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) for treating lateral elbow pain in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 4. Art. No.: CD003686. DOI: 10.1002/14651858.CD003686.

Grosch S., Tegede, I., Niederberger E., Brautigam L. y Geisslinger G. (2001). COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. *FASEB J.*; 15:2742–2744.

Hackstein H., Morelli AE., Larregina AT., Ganster RW., Papworth GD., Logar AJ, y col. (2001). Aspirin inhibits in vitro maturation and in vivo immunostimulatory function of murine myeloid dendritic cells. *J Immunol*; 166:7053–62.

Hall FL., Han B., Kundu RK., Yee A., Nimni ME. y Gordon EM. (2001). Phenotypic differentiation of TGF-beta1-responsive pluripotent premesenchymal phehematopoietic progenitor (P4 stem) cells from murine bone marrow. *J. Hematother Stem Cell Res*, 10 (2):261-271.

Haradan S. y Rodan GA. (2003). Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*; 423: 349-355.

Harder AT. y An YH. (2003). The mechanisms of the inhibitory effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on bone healing: a concise review. *J Clin Pharmacol*; 43:807-15.

Harris Re., Beebe-Donk J., Doss H. y Burr Doss D. (2005). Aspirin, Ibuprofen and other non-steroidal anti-inflammatory drugs in cancer prevention: a critical review of non-selective COX-2 blockade (review). *Oncol Rep*; 13(4):559-583.

Harrison JR., Lorenzo JA., Kawaguchi H., Raisz LG. y Pilbeam CC. (1994). Stimulation of prostaglandin E2 production by interleukin-1alfa and transforming growth factor alfa in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res.*, 9:817-823.

- Hawkins C. y Hanks C. (2000). The gastroduodenal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs. A review of the literature. *J Pain Symptom Manage.* 20(2):140-148.
- Heinemann DE., Lohmann C., Siggelkow H., Alves F., Engel I. y Koster G (2000a). Human osteoblast-like cells phagocytose mineral particles and express the macrophage marker CD68 in vitro. *J Bone Joint Surg Br*, 82(2):283-9.
- Hilário MO., Terreri MT. y Len CA. (2006). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cyclooxygenase 2 inhibitors. *J. Pediatr (Rio J)*. 82 (5 Suppl): S206-212.
- Hinz B., Cheremina O., Bachmakov J., Renner B., Zolk O., Fromm MF y Brune K. (2007). Dipyrene elicits substantial inhibition of peripheral cyclooxygenases in humans: new insights into the pharmacology of an old analgesic. *FASEB J.* 21:2343-2351.
- Hirata T., Ukawa H., Yamakuni H., Kato S y Takeuchi K. (1997). Cyclooxygenase isozymes in mucosal ulcerogenic and functional responses following barrier disruption in rat stomachs. *Br J Pharmacol*; 122(3):447-454.
- Ho ML., Chang JK., Tsai HT., Cho MH. y Wang GJ. (2001). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs arrest cell cycle in G0/G1 phase and induce cell death in osteoblast-enriched cultures. *J Musculoskeletal Res*; 5:279–89.
- Ho ML., Chang JK., Chuang LY., Hsu HK. y Wang GJ. (1999). Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and prostaglandins on osteoblastic functions. *Biochem. Pharmacol.*; 58: 983–990.
- Ho ML., Chang JK. y Wang GJ. (1995). Antiinflammatory drug effects on bone repair and remodelling in rabbits. *Chin Orthop Relat Res* (313): 270-278.
- Hofmann A., Ritz U., Hessmann MH., Schmid C., Tresch A., Rompe JD., Meurer A. y Rommens PM. (2008). Cell viability, osteoblast differentiation, and gene expression are altered in human osteoblast from hypertrophic fracture non-unions. *Bone*; 42: 894-906.

Ing SW. y Belury MA. (2011). Impact of conjugated linoleic acid on bone physiology: proposed mechanism involving inhibition of adipogenesis. *Nutrition Reviews* 69(3):123-131.

Ishibashi H., Karube S., Yamakawa A. y Koshihara Y. (1995). Interleukin-4 stimulates pro-alpha 1(VI) collagen gene expression in cultured human osteoblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 211(3), 727-734.

Ivanchuk SM. y Rutka JT. (2004). The cell cycle: accelerators, brakes, and checkpoints. *Neurosurgery*; 54(3):629:699

Jakse N., Payer M., Tangl S., Berghold A., Kirmeier R. y Lorenzoni M. (2007) Influence of low-level laser treatment on bone regeneration and osseointegration of dental implant following sinus augmentation: an experimental study on sheep. *Clin Oral Implant Res*; 18: 517-524.

Jones R. (2001). Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug Prescribing: past, present and future. *Am J Med*; 110: 4S-7S.

Karsenty G. (2000). Role of Cbfa1 in osteoblast differentiation and function. *Semin Cell Dev Biol*, 11(5): 343-346.

Kaspar D., Hedrich CM., Schmidt C., Liedert A., Claes LE. y Ignatus AA. (2005). Diclofenac inhibits proliferation and matrix formation of osteoblasts cells. *Unfallchirurg.*, 108(1), 20-24.

Kassen M., Abdallah BM., y Saeed H. (2008). Osteoblastic cells: Differentiation and trans-differentiation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 473:183-187.

Kawaguchi JD., Rosen DS. y Reynolds MA (2000). The role of prostaglandins in the regulation of bone metabolism. *Clin Orthop Relat Res* (313)36-46.

Kelly JP., Kauffman DW., Jurgelon., Shehan J., Koff RS. Y Shapiro S. (1996). Risk of aspirin-associated major upper gastrointestinal bleeding with enteric-coated or buffered product. *Lancet*; 348:1413-1416.

Khan K., McKay H., Kannus P., Bailey D., Wark J. y Bennell K. (2001). Physical activity and bone health. (1ªed). Champaign: Human Kinetics.

- Kiefer JR., Pawlitz JL., Moreland KT., Stegeman RA., Hood WF., Gierse JK., Stevens AM., Goodwin DC., Rowlinson SW., Marnett LJ., Stallings WC. y Kurumbail RG. (2000). Structural insights into the stereochemistry of the cyclooxygenase reaction. *Nature*, 405(6782): 97-101.
- Kikuchi T., Matsuguchi T., Tsuboi N., Mitani A., Tanaka S., Matsuoka M., Yamamoto G., Hishikawa T., Noguchi T. y Yoshikai Y. (2001). Gene expression of osteoclast differentiation factor is induced by lipopolysaccharide in mouse osteoblasts via Toll-like receptors. *J Immunol*, 166(5):3574-9.
- Kis B., Snipes A., Isse T., Nagy K. y Busija DW. (2003). Putative cyclooxygenase-3 expression in rat brain cells. *J Cerebral Blood Flow and Metabolism* 23(11): 1287-1292.
- Komori T. (2010) Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res*; 339:189– 195.
- Kronenberg HM. (2003) Developmental regulation of the growth plate. *Nature*, 423:332-336.
- Ksiezopolska-Orlowska K. 2010 Change in bone mechanical strength in response to physical therapy. *Pol Arch Med Wewn*; 120 (9):368-373.
- Kudo I., Murakami M., Hara S. y Inoue K. (1993). Mammalian non-pancreatic phospholipases A2. *Biochim Biophys Acta.*, 1170:217-231.
- Kulinsky VI. (2007). Biochemical aspects of inflammation. *Biochemistry*. 72(6):595-607.
- Lane NE., Bayer DC., Nevilt MC., Pressman AR. y Cummings SR (1997). Aspirin and nonsteroidal antiinflammatory drug use in elderly woman: effects on a marker of bone resorption. The study os Osteoporotic Fractures Research Group. *J Rheumatol* 24(6): 1132-6.
- LaStayo PC., Winters KM., y Hardy M. (2003). Fracture healing: bone healing, fracture management, and current concepts related to the hand. *J Hand Ther*, 16(2): 81-93.



Lian JB. y Stein GS. (1992). Concepts of osteoblast growth and differentiation : basis for modulation of bone cell development and tissue formation. *Crit Rev Oral Biol Med*, 3(3), 269-305.

Lian JB. y Stayn GS. (1993). The developmental stage of osteoblast growth and differentiation exhibit selective responses of genes to growth factors (TGF beta1) and hormones (vitamin D and Glucocorticoids). *J Oral Implantol.*, 19, 95-105.

Lian JB., Stein GS., Canalis E., Gehron Robey P. y Boskey AL. (1999). Bone formation: osteoblast lineage cells, growth factors, matrix proteins, and the mineralization process. In Favus MJ. (4<sup>a</sup>ed.), *Primer on the Metabolic Bone Diseases of Mineral Metabolism*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Liao LM., Vaughan TL., Corley DA., Cool MB., Casson AG., Kamangar F., Abnet CC. y col. (2011). Non-steroidal anti-inflammatory drugs use reduces risk for adenocarcinomas of the esophagus and esophagogastric junction in a pooled analysis. *Gastroenterology* IN PRESS.

Lisignoli G., Toneguzzi S., Piacenti A., Cristino S., Cattini L., Grassi y Facchini A. (2004). Recruitment and proliferation of T lymphocytes is supported by IFN $\gamma$ - and TNF $\alpha$ -activated human osteoblasts: involvement of CD54 (ICAM-1) and CD106 (VCAM-1) adhesion molecules and CXCR3 chemokine receptor. *J Cell Physiol*, 198, 388-398.

Liu F., Malaval L., Gupta AK. y Aubin JE, (1994). Simultaneous detection of multiple bone-related mRNAs and protein expression during osteoblast differentiation : polymerase chain reaction and immunocytochemical studies ta the single cell level. *Dev Biol*, 166(1): 220-34.

Lohmann CH., Schwartz Z., Koster G., Janh U., Buchhorn GH., McDougall MJ., Casasolo D., Liu Y., Sylvia VL., Dean DD. y Boyan BD. (2000). Phagocytosis of wear debris by osteoblasts affects differentiation and local factor production in a manner dependent on particle composition. *Biomaterials*, 21(6): 551-561.

Malaval L., Modrowski D., Gupta AK. y Aubin JE, (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.

- Manolagas SC. y Jilka BL. (1995) Bone Marrow, Cytokines and bone remodeling. *New Engl J Med*; 332: 305-311.
- Manolagas SC. (2000). Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.*, 21, 115-137.
- Martindale W. (2000). *The extra pharmacopoeia* (32ed.) London: the pharmaceutical press.
- Martinez LL., Oliveira MA., Miguel AS., Rastelli VM., Cruz JW., Tostes RC., Carvalho MH., Nigro D. y Fortes ZB. (2005) Losartan attenuates the antimigratory effect of diclofenac in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*; 46:190-199.
- Martini L., Giavaresi G., Fini M., Borsari V., Torricelli P., Giardino R. (2006) Early effect extracorporeal shock wave treatment on osteoblast-like cells: A comparative study between electromagnetic and electrohydraulic devices. *J Trauma*; 61: 1198-206.
- Martini L, Giavaresi G, Fini M, Torricelli P, de Pretto M, Schaden W. (2003b). Effect of extracorporeal shock wave therapy on osteoblastic-like cells. *Clin Orthop Relat R.*; 413: 269-280.
- Martins MV., Silva MA., Medici Filho E., Morales LC., Castilho JC. y Rocha R. (2005) Evaluation of digital optical density of bone repair in rats medicated with ketoprofen. *Braz. Dent J.* 16(3): 207-212.
- Matsumoto MA., De Oliveira A., Ribeiro PD., Filho HN. Y Ribeiro DA. (2008) Short-term administration of on-selective and selective cox-2 nsoids do not interfere with bone repair in rats. *J. Mol Hist*; 38:381-387.
- Matsuo K. y Irie N. (2008) Osteoclast-osteoblast communication. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 423:201-209.
- Mehlich DR. y Frakes LA. (1984). A controlled comparative evaluation of acetaminophen and aspirin in the treatment of postoperative pain. *Clin Ther*, 7:89-97.

McGee-Lawrence ME. y Westendorf JJ. (2011). Histone deacetylases in skeletal development and bone mass maintenance. *Gene*, 474:1–11

Montes MJ., Aleman P., García-Tortosa C., Borja C., Ruiz C. y García-Olivares E. (1996). Cultured human decidual stromal cells express antigens associated with hematopoietic cells. *J Reprod Immunol.*, 30, 53-56.

Morton DJ., Barret-Connor EL. y Schneider DL. (1998). Nonsteroidal antiinflammatory drugs and bone mineral density in older women: the Rancho Bernardo study. *J Bone Miner Res*, 13(12):1924-31.

Mott DA., Mailhot J., Cuenin MF., Sharawy M. y 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.

Mousa SA. (2008). Cell Adhesion Molecules: Potential Therapeutic & Diagnostic Implications. *Mol Biotechnol*; 38:33–40.

Morita I., y Schindler M. (1995). Differential intracellular locations for prostaglandin endoperoxide synthase 1 and 2. *J Biol Chem*; 270:10902-8.

Müller M., Raabe O., Addickis K., Wenisch S. y Arnold S. (2011) Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on proliferation, differentiation and migration in equine mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int*; Mar 1;35(3):235-48.

Muñoz J., Navarro C., Noriega V., Pinaridi G., Sierralta F., Prieto JC. y Miranda HF. (2010). Synergy Between COX-3 inhibitors in two animal models of pain. *Inflammapharmacol*; 18:65-71.

Murshed M., Harmey D., Millan JL., McKee MD. y Karsenty G. (2005) Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restrictions of ECM mineralization to bone. *Genes Dev*; 19:1093-1104.

Naruse T., Nishida Y., Hosono K. y Ishiguro N. (2006). Meloxicam inhibits osteosarcoma growth, invasiveness and metástasis by COX-2 dependent and independent routes. *Carcinogenesis*; 27(3):584-592.

Naruyima S y Fitzgerald GA (2001). Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *J Clin Invest*; 108:25-30.

Nelissen JM., Tosensma R., Pluyter M., Adema GJ., Raymakers RA., van Kooyk Y. y Figdor CG. (2000). Molecular análisis of the hematopoyesis supporting osteoblastic cell line U2-OS. *Exp Hematol*; 28(4): 422-432.

Nogueira GT., Mesquita-Ferrari RA., Souza NHC., Artilheiro PP., Albertini R., Bussadori SK. y Fernandes KPS. (2011). Effect of low-level laser therapy on proliferation, differentiation, and adhesion of steroid-treated osteoblast. *Lasers Med Sci*; publicado on line 22 diciembre 2011. DOI 10.1007/s10103-011-1035-6.

Okada Y., Morimoto I., Ura K., Watanabe K., Eto S., Kumegawa M, Raisz L., Pilbeam C. y Tanaka Y (2002). Cell-to-cell adhesión via intercellular adhesión molecule-1 and leukocyte funtion-associated antigen-1 pathway is involve in 1alpha,25(OH)2D3, PTH and IL-1alpha-induced osteoclast differentiation and bone resorption. *Endocr J*, 49(4), 483-95.

Ormerod MG. (2000). *Flow cytometry*. Oxford: University Press.

Onoe Y., Miyaura C., Kaminakayashini T., Nagai Y., Noguchi K., Chen QR., Seo H., Ohta H., Nozawa S., Kudo I. y Suda T (1996). IL-3 and IL-4 inhibit bone resorption by suppressing cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin synthesis in osteoblasts. *J Immunol*. 156: 758-764.

Papachroni KK., Karatzas DN., Papavassiliou KA., Basdra EK. y Papacassiliou GP. *Mechanotransduction in osteoblast regulation and bone disease* (2009). *Trends Mol Med*. 15(5):208-216.

Pape HC., Marcucio R., Humphrey C., Colnot .C, Knobe M. y Harvey EJ. (2010). Trauma-Induced inflammation and fracture healing. *J Orthop Trauma*. 24:522-525.

Parfitt AM. (1991) B.K. Hall (Ed.) *In Bone, The Osteoblast and Osteocyte*. The Telford Press, London 351-426.

Peck WA. y Woods WL. (1998). The cells of bone. *In Osteoporosis: etiology, diagnosis and management*. New York: Raven Press.

Pérez E., García- Martínez O., Arroyo-Morales M., Reyes-Botella C. y Ruiz C. (2006). Modulation of antigenic phenotype in cultured human osteoblast-like cells by FGFb, FGFbeta1, PDGF-BB, IL-2, IL-1beta, LPS and IFNgamma. *Biosci. Rep*, 26(4), 281-289.

Pérez Ruiz A., López Mantecón AM. y Grau León I. (2002). Antiinflamatorios no esteroideos (AINES). Consideraciones para su uso estomatológico. *Rev. Cubana Estomatol*; 39(2).

Pfeilschifter J. y Mundy GR. (1987). Modulation of type beta transforming growth factor activity in bone cultures by osteotropic hormones. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84(7), 2024-28.

Pilbeam CC., Kawaguchi H., Hakeda Y., Voznesenasky O., Alander CB. y Raisz LG. (1995). Differential regulation of inducible and constitutive prostaglandin endoperoxide synthase in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Biol Chem*, 268:25643-25649.

Pioletti DP., Takei H., Kwon SY., Wood D. y Sung KL. (1999). The cytotoxic effects of titanium particles phagocytosed by osteoblasts. *J Biomed Mater Res*, 46(3):399-407.

Poirier J. (2002). *Histología*. (1ª ed.) Madrid: Masson.

Prescott LF. (2000). Paracetamol, alcohol and the liver. *Br J Clin Pharmacol*, 49(4); 291-301.

Prieto J.M. (2007). Antiinflamatorios No Esteroideos (AINES). ¿Dónde estamos y hacia dónde nos dirigimos? (Primera Parte). *Cient Dent*; 4(3):203-212.

Prouillet C., Mazičre JC., Mazičre C., Wattel A., Brazier M., y Kamel S. (2004). Stimulatory effect of naturally occurring flavonols quercetin and kaempferol on alkaline phosphatase activity in MG63 human osteoblasts through ERK and estrogen receptor pathway. *Biochemical Pharmacology*, 67, 1307-1313.

Puzas JE. (1996). Osteoblasts cell biology: lineage and functions. In *Primer of the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. Favus MJ., Editor Lippincott- Raven Press. New York, New York, USA. 1-16.

- Radi ZA. y Khan (2005). Effects os cyclooxygenase inhibition on bone, tendon and ligament healing. *Inflamm Res.* 54(9):358-366.
- Rang HP., Dale MM., Ritter JM. Y Flower RJ. (2003). *Farmacología.* (5ªed.) Ed. Elsevier Churchill livingstone.
- R.M.A. Boletín Informativo del Centro de Farmacovigilancia de la Comunidad de Madrid, Mayo 2002; 9:1-5.
- Reinholt FP., Hultenby MJ. y Heinegard D. (1990). Osteopontin: a possible anchor of osteoclast to bone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87 (12), 4473-4475.
- Reyes-Botella C., Montes MJ., Abadía-Molina AC., Vallecillos-Capilla MF. y Ruiz C. (1999). CD10 expression in cultured human osteoblast-like cells. *Folia Biologica (Praha)*, 45, 257-260.
- Reyes-Botella C., Montes MJ, Vallecillos-Capilla MF., Olivares EG. y Ruiz C. (2000). Expresión of molecules envolved in antigen presentation and T cell activation (HLA-DR, CD80, CD86, CD44 and CD54) by cultured human osteoblast. *J Periodntol.*, 71, 614-617.
- Reyes-Botella C., Montes MJ., Vallecillos-Capilla MF., Olivares EG. y Ruiz C. (2002a). Antigenic Phenotype of cultured human osteoblast-like cells. *Cell Physiol Biochem*, 12, 359-364.
- Reyes-Botella C., Vallecillos-Capilla MF., Olivares EG. y Ruiz C. (2002b). Effect of different growth factors on human cultured osteoblast-like cells. *Cell Physiol Biochem*, 12 353-358.
- Rezzonico R., Schmid-Alliana A., Romey G., Bourget-Ponzio I., Breuil V., Breitmayer V., Tartare-Deckert S., Rossi B. y Schmid-Antomarchi H. (2002). Prostaglandin E2 induces interaction between hSlo potassium channel and Syk tyrosine kinase in osteosarcoma cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, 17, 869-878.
- Rifas L., Arackal S. y Wietzman MN. (2003). Inflammatory T cells rapidly induce differentiation of human bone marrow stromal cells into mature osteoblasts. *J Cell Biochem*, 88(4), 650-659.

Robey PG., Young MF., Flanders KC., Roche NS., Kondaiah P., Reddi AH., Termine J.D., Sporn MB. y Roberts AB. (1987). Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor-type beta (TGF-beta) in vitro. *J Cell Biol.* 105(1), 457-463.

Robling AG., Castillo AB. y Turner CH. (2006). Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu Rev Biomed Eng.* 8: 455-498.

Rodríguez MJ, Contreras D, Gálvez R, Castro A, Camba MA, Busquets C, Herrera J. (2003). Double-blind evaluation of short-term analgesic efficacy of orally administered Dexketoprofen trometamol and jectorolac in bone cancer pain. *Pain*; 104: 103-110.

Rodríguez-González A., Ramirez de Molina A., Fernández F y Lacal JC. (2004) Choline kinase inhibition induces the increase in ceramides resulting in a highly and selective cytotoxic antitumoral strategy as a potential mechanism of action. *Oncogene*; 23:8247-8259.

Romano CL., Duci D., Romano D., Mazza M. y Meani E. (2004). Celecoxib versus indomethacin in the prevention of heterotopic ossification after total hip arthroplasty. *J Arthroplasty*, 19:14-18.

Roodman GD. (1996). Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocrinol Rev.* 17, 308-332.

Rosales-Leal JI., Rodríguez-Valverde MA., Mazzaglia G., Ramón-Torregrosa PJ., Díaz-Rodríguez L., García-Martínez O., Vallecillo-Capilla M, Ruiz C, Cabrerizo-Vílchez MA. (2010) Effect of roughness, wettability and morphology of engineered titanium surfaces on osteoblast-like cell adhesion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*; 365: 222-229.

Rossat J., Maillard M., Nussberger J. y col. (1999). Renal effects of selective cyclooxygenase-2 inhibition in normotensive salt-depleted subjects. *Clinical Pharmacol Ther*; 66:76-84.

Ruiz C., Pérez E., Vallecillo-Capilla M. y Reyes-Botella C. (2003). Phagocytosis and allogeneic T cell stimulation by cultured human osteoblast-like cells. *Cell Physiol Biochem*; 13(5), 309-314.

- Ruiz C., Reyes-Botella C., García-Martínez O. y Montes MJ. (2004). Modulation of antigenic phenotype by IL-1beta, IFNgamma and TGFbeta on cultured human decidual stromal cells. *Biosci Rep*; 24(1), 55-62.
- Ruiz C., Pérez E., García-Martínez O., Díaz L., Arroyo-Morales M. y Reyes-Botella C. (2007). Expression of cytokines IL-4, IL-12, IL-15, IL-18, IFN and modulation by different growth factors in cultured human osteoblast-like cells. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*; 25(5):286-292.
- Ruth-Selbach US., Tegeder I., Brune K. y Geisslinger G. (1999). Acetaminophen inhibits spinal prostaglandin E2 release after peripheral noxious stimulation. *Anesthesiology*, 91:231-239.
- Salari P. y Abdollahi M. (2009) Controversial effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on bone: a review. *Inflamm Allergy Drug Targets*; 8(3):169-75.
- Sánchez Madrid F. y González-Amaro R. (2003). Moléculas de adherencia. En *Inmunologíaonline*. ISBN 84-607-6953-4 @ Inmunología.
- Saudan M., Saudan P., Perneger T., Riamd N., Keller A. y Hoffmeyer P. (2007). Celecoxib versus ibuprofen in the prevention of heterotopic ossification following total hip replacement: a prospective randomised trial. *J Bone Joint Surg Br* 89: 155-159.
- Salvi GE. y Lang NP. (2005). The effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (selective and non selective) on the treatment of periodontal diseases. *Curr Pharm Des*. 11(14):1757-1769.
- Scahfer AI. (1995). Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on platelet function and systemic hemostasis. *J Clin Pharmacol*; 35(3):209-219.
- Schindeler A., McDonald MM., Bokko P. y Little DG. (2008). Bone remodeling during fracture repair: the cellular picture. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 19:459-466.
- Schrum LW., Bost KL., Hudson MC. y Marriot I. (2003a). Bacterial infection induces expression of functional MHC class II molecules in murine and human osteoblasts. *Bone*, 33(5): 812-821.



Schrum LW., Marriot I., butler BR., Thomas EK., Hudson MC. y Bost KL. (2003b). Functional CD40 expression induced following bacterial infection of mouse and human osteoblasts. *Infect Immun*; 71(3): 1209-1216.

Seeman E. (2002). Pathogenesis of bone fragility in women and men. *Lancet*, 359, 1841-1850.

Seeman E. y Delmas PD, (2006). Bone quality- the material and structural basis of bone strength and fragility. *N Engl J Med*; 354:2250-2261.

Senna GE., Passalacqua G., Andri G., Dama Ar., Albano M., Fregonese L. y Amdri L. (1996). Nimesulide in the treatment of patients intolerant of aspirin and other NSAIDs. *Drug Saf*. 14(2):94-103.

Serhan CN. (2006). Resolution Phases of Inflammation: Novel Endogenous Antiinflammatory and Proresolving Lipid Mediators and Pathways. *Annu Rev Immunol*.

Shiff SJ., Koutsos MI., Qiao L. y Rigas B. (1996). Nonsteroidal antiinflammatory drugs inhibit the proliferation of colon adenocarcinoma cells: effects on cell cycle and apoptosis. *Exp. Cell Res*; 222:179–188.

Si-Young P., Seong-Hwan M., Moon-Soo P., Kyung-Soo O. y Hwan-Mo L. (2005). The effects of Ketorolac Injected via patient controlled analgesia postoperatively on spinal fusion. *Yonsei Med J*. 46(2): 245-250.

Simon AM., Manigrasso MB. y O'Connor JP. (2002). Cyclooxygenase-2 function is essential for bone fracture healing. *J Bone Miner Res*; 17:963-976.

Simon LS. (2005). The COX-2 inhibitors: a reasoned review of the data. *Swiss Med Wkly*. 135(29-30): 419-424.

Simon AM. y O'Connor JP. (2007). Dose and time-dependent effects of cyclooxygenase-2 inhibition on fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am.*; 89(3):500-511.

Smith WL., DeWitt DL y Garavito RM. (2000) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit the proliferation of colon adenocarcinoma cells: effects on cell cycle and apoptosis. *Exp Cell Res*; 222(1):179-188.

Smith TH., Burger EH., y Huyghe JM. (2002). A case for strain-induced fluid flow as a regulator of BMU-Coupling and osteonal alignment. *J Bone Miner Res.* 17:2021-2029.

Sobolewski C., Cerella C., Dicato M., Ghibelli L. y Diederich M. (2010) *Inter. J. Cell Biology.* ID 215158.

Stanley KT., Vandort C., Motyl C., Endres J. y Fox DA. (2006). Immunocompetent properties of human osteoblast: interactions with T Lymphocytes. *J Bone Miner Res.* 21(1), 29-36.

Stein GS., Lian JB., Van Wijnen AJ. y Montecino MT. (1996). Transcripcional control of osteoblast growth and differentiation. *Physiol Rev.*, 76, 593-629.

Stevens A. y Lowe J. (2007). *Histología Humana* (3ªed).

Takeuchi Y., Fukumoto S. y Matsumoto T. (1995). Relationship between actions of transforming growth factor (TGF)-beta and cell surface expression of its receptors in clonal osteoblastic cells. *J Cell Physiol*, 162(3), 315-321.

Tolman EL., Fuller BL., Marinan BA., Capetola RJ., Levisnson SL. y Rosenthale ME (1983). Tissue selectivity and variability of effects of acetaminophen on arachidonic acid metabolism. *Prostaglandins Leukot Med*, 12: 347-356.

Tullberg-Reinert H. y 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), 271-276.

Udagawa N., Horwood NJ., Elliott J., Mackay A., Owens J., Okamura H., Kurimoto M., Chambers TJ., Martin TJ. Y Gillespie MT. (1997). Interleukin-18 (interferon-gamma-inducin factor) is produced by osteoblast and acts via granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and not via interferon gamma to inhibit osteoclast formation. *J Exp Med*; 185(6):1005-1012.

Vallano A., Llop R. y Bosch M. (2002). Beneficios y riesgos de los antiinflamatorios no esteroides inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa-2. *Medicina clínica*; 119(11):429-434.

Vandrovcová M. y Bacakova L. (2011) Adhesion, growth and differentiation of osteoblasts on surface-modified materials developed for bone implants. *Physiol. Res.* 60:403-417.

Van Gaalen S., Kruyt M., Maijer G., Mistry A., Mikos A., Van den Beuken J., Jansen J., de Groot K., Cancedda R., Olivo C., Yaszemski M. y Dhert D. (2008). Tissue engineering of bone. *Tissue Engineering*. Senior editor Van Blitterswijk C. Ed. Academic Press series in Biomedical engineering.

Van Staa TP., Leufkens HG. y Cooper C. (2000). Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of fractures. *Bone* 27: 563-568.

Vestergaard P., Hermann P., Jensen JEB., Eike P. y Mosekilde L. (2011) Effects of paracetamol, non-steroidal anti-inflammatory drugs, acetylsalicylic acid, and opioids on bone mineral density and risk of fracture: results of the Danish Osteoporosis Prevention Study (DOPS). *Osteoporos Int*, DOI 10.1007/s00198-011-1692-0.

Villalonga N., David M., Bielan' ska J., González T., Parra D., Soler C., Comes N., Valenzuela C. y Felipe A. (2010) Immunomodulatory effects of diclofenac in leukocytes through the targeting of Kv1.3 voltage-dependent potassium channels. *Biochem Pharmacol.*, 80: 858-866.

Vuolteenaho K., Moilanen T. y Moilanen E. (2007). Non-steroidal Anti-inflammatory drugs, cyclooxygenase-2 and the bone healing process. *Nordic Pharmacological Society. Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 102: 10-14.

Walter C., Klein MO., Pabst A., Al-Nawas B., Duschner H. y Ziebart T. (2010) Influence of biophosphonates on endothelial cells, fibroblasts, and osteogenic cells. *Clin Oral Invest.*; 14:35-41.

Wang QQ., Li W., Chen JS., Lu YC., Jiann BP., Chang HT., Hsu SS., Chen Wc., Huang JK., Ho CM y Jan CR. (2004). Effect of celecoxib on Ca<sup>2+</sup> movement and cell proliferation human osteoblasts. *Biochem Pharmacol*; 67(6):1123-1130.

Wang QQ., Li W. y Yang BC. (2011). Regulation on the biocompatibility of bioactive titanium metals by type I collagen. *J Biomed Mater Res A*; 99(1):125-134.

- Warner TD., Giuliano F., Vojnovic I., Bukasa A., Mitchell JA. Vane JR. (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 USA*; 96(13):7563-7568.
- Weinstein RS. y Manolagas SC. (2000). Apoptosis and osteoporosis. *Am. J. Med*; 108:153–164.
- Whelton A., Maurath CJ., Verburg KM. y Geis GS. (2000). Renal safety and tolerability of celecoxib, a novelcyclooxygenase-2 inhibitor. *Am J Ther*; 7:159–75.
- Wierkosz TA., Mitchell JA. y Bottinh RM. (1997). Paracetamol (acetaminophen) stimulates and inhibits COX activity in cell and tissue homogenates. *Pharmacologist*, 39(65): A242.
- Williams CS., Mann M. y DuBois RN. (1999). The role of cyclooxygenase in inflammation, cancer and development. *Oncogene*. 18:7908-7916.
- Wu Y., Zitelli JP., TenHuisen KS., Yu X. y Libera MR. (2011). Differential response of Staphylococci and osteoblasts to varying titanium surface roughness. *Biomaterials*; 32: 951-960.
- Xie C., Ming X., Wang Q., Schwarz EM., Guldberg RE., O'Keefe RJ. y Zhang X. (2008) COX-2 from the injury milieu is critical for the initiation of periosteal progenitor cell mediated bone healing. *Bone*. 43(6):1075-1083.
- Yang L., Tianzun T., Fengchen L. y col., (2001). Experimental study: the effect of desamethasone on adult osteoblast proliferation and differentiation. *Chin J Orthop (Chin)*, 21, 493-497.
- Yates AJ., Oreffo RO., Mayor K. y Mundy GR. (1991). Inhibition of bone resorption by inorganic phosphate is mediated by both reduced osteoclast formation and decreased activity of matured osteoclast. *J Bone Miner Res*, 6(5):472-8.
- Yonezawa T., Lee J-W., Hibino A., Asai M., Hojo H., Cha B-Y., Teruya T., Nagai K., Chung UI., Yagasaki K. y Woo J-T. (2011) Harmine promotes osteoblasts

differentiation through bone morphogenetic protein signaling. *Biochem, Biophys, Res Commun*, 409(2):260-265.

Yuan CJ., Mandal AK., Zhang Z. y Mukherjee AB. (2000). Transcriptional regulation of cyclooxygenase-2 gene expression: novel effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer Res.*, 60:1084-1091.

Zaidi M, (1990). Calcium receptors on eukaryotic cell with especial reference to the osteoclast. *Biocell Rep*, 10(6):493-507.

Zhao W., Zhou SF., Zhang ZP., Xu GP., Li XB. y Yan JL. (2011) Gambogic acid inhibits the growth of osteosarcoma cells in vitro by inducing apoptosis and cell cycle arrest. *Oncol Rep.*; 25(5):1289-1295.

Zhang G., Tu C., Zhang G., Zhou G. y Zheng W. (2000). Indometacin induces apoptosis and inhibits proliferation in chronic myeloid leukemia cells. *Leuk Res*; 24 (5):385-392.

