

**VALORACIÓN DEL EFECTO DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DEL
ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA SOBRE DISTINTOS PARÁMETROS
DEL OSTEOLASTO.**

**ASSESSMENT OF THE EFFECT OF EXTRA VIRGIN OLIVE OIL PHENOLIC
COMPOUNDS ON DIFFERENT OSTEOLAST PARAMETERS**



UNIVERSIDAD DE GRANADA



**INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS
“FEDERICO OLÓRIZ”**

TESIS DOCTORAL

ESCUELA DE DOCTORADO DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE DOCTORADO DE MEDICINA CLÍNICA Y SALUD PÚBLICA

Lucía Melguizo Rodríguez

Granada 2018

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Lucía Raquel Melguizo Rodríguez
ISBN: 978-84-1306-088-0
URI: <http://hdl.handle.net/10481/54753>

ÍNDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	9
MARCO TEÓRICO	12
1. EL TEJIDO ÓSEO	12
1.1. Componente celular.....	12
1.1.1. El osteoblasto	13
1.1.1.1 Ontogenia del osteoblasto	14
1.1.1.2 Diferenciación	15
1.1.1.3 Identificación.....	16
1.1.1.3.1. Identificación morfológica	16
1.1.1.3.2. Identificación bioquímica.....	17
1.1.1.3.3 Identificación antigénica	18
1.1.1.3.4 Identificación génica	21
1.1.1.4 Funciones del osteoblasto.....	23
1.1.2. Osteocitos	25
1.1.3. Osteoclastos.....	26
1.2. Matriz ósea	27
1.2.1. Matriz inorgánica	27
1.2.2. Matriz orgánica	28
1.3. Formación del tejido óseo	30
1.4. Remodelado óseo	31

2.	DIETA MEDITERRÁNEA.....	33
2.2	Aceite de oliva virgen extra	34
2.2.2	Composición.....	34
2.2.2.1	Ácidos grasos, triacilgliceroles y gliceroles parciales.....	34
2.2.2.2	Hidrocarburos	35
2.2.2.3	Tocoferoles	35
2.2.2.4	Pigmentos	36
2.2.2.5	Alcoholes alifáticos y aromáticos	36
2.2.2.6	Esteroles	37
2.2.2.7	Ácido triterpénicos	37
2.2.2.8	Compuestos volátiles.....	37
2.2.2.9	Compuestos fenólicos	38
2.2.3	Beneficios del aceite sobre la salud.....	40
2.2.3.1	Aceite y enfermedades cardiovasculares.....	40
2.2.3.2	Aceite y diabetes, síndrome metabólico y obesidad	41
2.2.3.3	Aceite de oliva y cáncer	41
2.2.3.4	Aceite de oliva y patología ósea.....	43
	BIBLIOGRAFÍA.....	47
	JUSTIFICACIÓN	76
	HIPÓTESIS	77
	OBJETIVO GENERAL	78
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	78

RESULTADOS Y DISCUSIÓN/ RESULTS & DISCUSSION	79
OBJETIVO 1	79
OBJETIVO 2	97
OBJETIVO 3	122
CONCLUSIONES	143
CONCLUSIONS	144

RESUMEN

El aceite de oliva virgen extra (AOVE) representa la principal fuente de lípidos de la Dieta Mediterránea debido a su elevada calidad nutricional y a sus efectos beneficiosos sobre los estados de salud y enfermedad de los consumidores, actuando de forma favorable a nivel de distintas patologías como enfermedades cardiovasculares, cáncer, patologías óseas, entre otras. El AOVE se compone de una fracción mayoritaria, representada por triacilglicerol principalmente, ácidos grasos, mono y diacilglicerol; y una fracción minoritaria donde destacan los compuestos fenólicos que se organizan en cinco grandes grupos: flavonoides, lignanos, ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos y secoiridoides. La composición en compuestos fenólicos del AOVE depende de las condiciones genéticas, agronómicas y tecnológicas de producción y almacenamiento.

La salud ósea constituye uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial. El metabolismo del hueso está regulado por interacciones entre el potencial genético del individuo, el ambiente y por supuesto, factores nutricionales entre los que se incluyen minerales como el calcio y la vitamina D. Los compuestos fenólicos presentes en diversas especies vegetales pueden modular la densidad mineral ósea, bien modificando la función de los osteoblastos, a través de la activación de distintos factores de transcripción o proteínas morfogenéticas óseas, o bien inhibiendo la osteoclastogénesis.

El osteoblasto es la célula responsable de la formación y regeneración ósea. Puede ser caracterizado atendiendo a su morfología, perfil antigénico y capacidad funcional. Esta célula, además de secretar distintas sustancias que contribuyen a la formación de la matriz ósea (fosfatasa alcalina, proteínas morfogenéticas, osteocalcina, entre otras), presenta un fenotipo antigénico compatible con la célula presentadora de antígeno (CD54, 6

CD80, CD86 y HLA-DR) y capacidad fagocítica, por lo que, además de la actividad formadora de hueso, se le atribuyen funciones inmunes.

El objetivo principal planteado para esta tesis fue analizar el efecto de los compuestos fenólicos presentes en el AOVE y extractos fenólicos de diversas variedades de AOVE sobre distintos parámetros celulares del osteoblasto, utilizando la línea celular tipificada MG-63.

La línea MG-63 de osteoblastos humanos fue tratada con ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido cumárico, luteolina y apigenina durante 24 horas, a la dosis de 10^{-6} M y 10^{-8} M. La actividad fosfatasa alcalina fue cuantificada mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 405 nm. La determinación del efecto de los compuestos fenólicos previamente citados sobre la expresión antigénica de la línea MG-63 se llevó a cabo mediante citometría de flujo. El perfil genético del osteoblasto fue evaluado mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Paralelamente, la línea MG-63 fue tratada con extractos fenólicos de distintas variedades de AOVE (picual, arbequina, hojiblanca y picudo). La acción de dichos extractos sobre la actividad fosfatasa alcalina y perfil antigénico fue determinada mediante las técnicas descritas previamente. La capacidad fagocítica fue estudiada mediante citometría de flujo.

Los resultados que se desprenden de este estudio demostraron que los compuestos fenólicos del AOVE inducen la maduración celular *in vitro* de las células osteoblásticas de la línea MG-63, incrementado la producción de fosfatasa alcalina y disminuyendo la expresión de antígenos relacionados con funciones inmunes tras las 24 horas del tratamiento. El estudio de los marcadores genéticos del osteoblasto mostró la capacidad de los compuestos fenólicos del AOVE para modular la expresión de distintos marcadores de crecimiento y diferenciación/maduración en la línea osteoblástica MG-63,

observándose un incremento en la expresión de los genes TGF β , TGF β -R1, TGF β -R2, TGF β -R3, BMP-2, BMP-7, Runx2, ALP, OSC, OSX, Col I y OPN con la mayoría de los tratamientos con compuestos fenólicos.

El análisis del efecto de extractos de diferentes variedades de AOVE ricos en compuestos fenólicos mostró, igualmente, un incremento en la síntesis de fosfatasa alcalina y una disminución de la capacidad fagocítica y de la expresión de los antígenos CD54, CD80 y HLA-DR.

Estos resultados sugieren que los compuestos fenólicos presentes en el AOVE tienen un efecto estimulante sobre el osteoblasto, pudiendo modular la fisiología del hueso y contribuyendo a la mejora de la salud ósea.

ABSTRACT

Extra virgin olive oil (EVOO) is the main source of lipids in the Mediterranean diet. It has high nutritional quality and exerts beneficial effects on the health of consumers, acting favorably against cardiovascular and bone diseases and cancer, among other diseases. EVOO comprises a majority fraction mainly composed of triglycerides, fatty acids, and mono- and diacylglycerols, and a minority fraction that includes phenolic compounds organized in five major groups: flavonoids, lignans, phenolic acids, phenolic alcohols, and secoiridoids. The composition of phenolic compounds in EVOO depends on genetic and agronomic factors and on technological production and storage conditions.

Bone disease is an important public health problem worldwide. Bone metabolism is regulated by interactions among the genetic potential of the individual, the environment, and nutritional factors, including minerals (e.g., calcium) and vitamin D. Phenolic compounds from various vegetable species have been found to modulate bone mineral density, either by modifying osteoblast function through the activation of different transcription factors or bone morphogenetic proteins or by inhibiting osteoclastogenesis.

Osteoblasts are the cells responsible for bone formation and regeneration and can be classified according to their morphology, antigen profile, and functional capacity. They secrete various substances that contribute to bone matrix formation (alkaline phosphatase, morphogenetic proteins, osteocalcin, among others) and also show an antigen phenotype compatible with antigen-presenting cells (CD54, CD80, CD86, and HLA-DR) and phagocytic capacity. Osteoblasts are therefore attributed with immune functions besides their bone-forming activity.

The main objective of this thesis was to determine the effect of phenolic compounds present in EVOO and phenolic extracts from various EVOO varieties on different osteoblast parameters, using the MG63 cell line.

MG63 human osteoblast cell line was treated for 24 h with caffeic acid, ferulic acid, coumaric acid, luteolin, or apigenin at doses of 10^{-6} M and 10^{-8} M. Alkaline phosphatase (ALP) activity was quantified by spectrophotometry at a wavelength of 405 nm. The effect of the aforementioned phenolic compounds on the antigen expression of MG63 was evaluated by flow cytometry. The osteoblast genetic profile was evaluated by real-time polymerase chain reaction. In parallel, MG63 was treated with phenolic extracts of various EVOO varieties (Picual, Arbequina, Hojiblanca, and Picudo), evaluating their effects on ALP activity and antigen profile using the aforementioned techniques and analyzing their phagocytic capacity by means of flow cytometry.

According to the present results, EVOO phenolic compounds induce *in vitro* cell maturation of MG63 osteoblast cells, increasing ALP production and reducing the expression of immune function-related antigens after 24 h of treatment. The study of osteoblast genetic markers revealed the capacity of EVOO phenolic compounds to modulate the expression of various growth and differentiation/maturation markers in the MG63 osteoblast line, producing an increase in the expression of TGF β , TGF β -R1, TGF β -R2, TGF β -R3, BMP-2, BMP-7, Runx2, ALP, OSC, OSX, Col I, and OPN genes. Analysis of the effect of extracts from various EVOO varieties rich in phenolic compounds also showed an increase in ALP synthesis and a reduction in phagocytic capacity and in the expression of CD54, CD80, and HLA-DR antigens.

These results suggest that the phenolic compounds present in EVOO have a stimulating effect on osteoblasts, modulating bone physiology and contributing to an improvement in bone health.

MARCO TEÓRICO

1. EL TEJIDO ÓSEO

El hueso es un tejido conectivo mineralizado altamente dinámico que responde a estímulos fisiológicos, metabólicos, estrés funcional y ante otros cambios medioambientales. El hueso ejerce funciones importantes en el cuerpo como la locomoción, el soporte y protección de los tejidos blandos, el almacenamiento de calcio y fósforo y el refugio de la médula ósea (1).

La remodelación ósea es un proceso muy complejo que resulta de un equilibrio entre los procesos de formación y destrucción ósea. Este equilibrio entre la formación y la reabsorción del hueso es necesario para una adecuada salud ósea y depende de la acción de varios factores locales y sistémicos, entre los que se encuentran distintas hormonas, citoquinas y quimiocinas así como la estimulación biomecánica.

Histológicamente, el hueso está formado por un componente celular y una matriz orgánica calcificada, constituida por fibras y por una sustancia fundamental que contiene sales de calcio, que constituyen la característica principal de este tejido, y le confieren sus propiedades (2,3).

1.1. Componente celular

Las células óseas constituyen aproximadamente el 10% del volumen total de hueso (4). Para poder llevar a cabo sus funciones estas células se organizan especializadamente según su morfología, sus funciones y su localización. Así pues, podemos distinguir tres tipos de células que conforman el hueso: osteoblastos, osteocitos y osteoclastos, que surgen de dos linajes celulares: células osteoprogenitoras del linaje de

células madre mesenquimales, que se diferencian en osteoblastos y osteocitos, y células de origen hematopoyético de las que se originan los osteoclastos (5,6).

1.1.1. El osteoblasto

Los osteoblastos se localizan en la superficie del hueso y representan entre 4-6% de las células totales residentes en el hueso (5,7,8). Su principal función es la síntesis y secreción de la matriz ósea orgánica, también conocida como matriz osteoide (7). 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.

Son células inicialmente cúbicas, que cambian a fusiformes cuando comienzan a proliferar, con un citoplasma basófilo del cual parten extensiones citoplasmáticas alargadas, mononucleares (aproximadamente 15-30 mm de diámetro), con un gran núcleo esférico y un nucléolo voluminoso (9,10). Además, estas células muestran características morfológicas propias de las células que sintetizan proteínas, que incluyen abundante retículo endoplasmático rugoso y aparato de Golgi prominente; así como, varias vesículas secretoras y vacuolas cargadas con estructuras fibrilares, muy probablemente de procolágeno y proteoglicanos (5,7). Cuando los osteoblastos están activos tienen una forma redondeada, oval o poliédrica, con un límite osteoide que las separa de la matriz mineralizada. Cuando secretan nueva matriz, los osteoblastos presentan gran cantidad de retículo endoplasmático, aparato de Golgi y mitocondrias.

Una vez que los osteoblastos han desempeñado su función como célula formadora de hueso, pueden quedarse inactivas perdiendo su capacidad sintética y adoptando una forma más plana, quedando como células de revestimiento o *lining cells* cubriendo toda

la superficie del hueso; o bien pueden ser atrapados en el frente de calcificación y convertirse en osteocitos; o morir y desaparecer del sitio de formación ósea (11,12).

1.1.1.1 Ontogenia del osteoblasto

Como muchas otras células del tejido conectivo (fibroblastos, condrocitos, mioblastos y adipocitos), los osteoblastos proceden de una célula madre mesenquimal (MSC) pluripotente común. Las MSC se definen por dos características: la capacidad de diferenciarse a osteoblastos, condrocitos y adipocitos y su capacidad de proliferación limitada, ya que entran en senescencia después de un cierto número de duplicaciones de la población en cultivo (13).

Las MSC forman células osteoprogenitoras que a su vez se diferenciarán en osteoblastos cuando el entorno presenta bajos niveles de estrés y alta concentración de oxígeno. Las células osteoprogenitoras también se localizan en el periostio, el endostio y los canales de Havers donde se encuentran a la espera de un estímulo para iniciar la proliferación y diferenciación a osteoblastos. Los factores responsables de esta inducción de las MSC hacia células osteoprogenitoras y osteoblastos incluyen proteínas morfogenéticas óseas (BMP), factor de crecimiento transformante β (TGF β), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento derivado de insulina (IGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) e interleuquinas (IL). Las células osteoprogenitoras también pueden formar cartílago en condiciones de tensión intermedia y baja concentración de oxígeno, e incluso tejido fibroso en ambientes sometidos a un gran estrés (8,14).

1.1.1.2 Diferenciación

La diferenciación de MSC en osteoblastos es un proceso altamente complejo y regulado, que puede definirse en cuatro fases consecutivas: 1. compromiso del linaje; 2. proliferación; 3. maduración de la matriz extracelular y 4. mineralización de la matriz (15). Cada una de estas fases se encuentra vinculada a la expresión de genes y factores específicos que regulan este proceso. Así, durante la primera fase, BMP y las vías de señalización Wnt, que son un grupo de vías implicadas en la transducción de señales, son las responsables del inicio de la diferenciación de la MSC hacia células osteoprogenitoras (16). Posteriormente en la fase 2, se produce la expresión, por parte de estas células osteoprogenitoras, del factor Runt-related transcription factor 2 (Runx2) y del colágeno tipo I (Col I) y sintetizan las histonas necesarias para garantizar la alta tasa de proliferación que caracteriza esta etapa. En la fase 3, la hormona paratiroidea (PTH) estimula la expresión celular de fosfatasa alcalina (ALP), Col I y sialoproteína ósea II (BSP II) induciendo, por tanto, la diferenciación a células preosteoblásticas. Durante la última etapa, bajo la influencia del IGF1 y la prostaglandina E2 (PGE2), las células preosteoblásticas se convierten en osteoblastos maduros que expresan osteocalcina (OSC), colagenasas y BSP I y II.

Este perfeccionado y pulido proceso, se encuentra además bajo la influencia de otros reguladores como: neurotransmisores, hormonas (PTH, Insulina), vitaminas (vitamina D 1,25 (OH) 2), factores de crecimiento (BMP, IGF y FGF), factores de transcripción, así como citoquinas de acción autocrina y paracrina, tales como IL-1, IL-6, IL-11, factores estimuladores de colonias (CSF), e incluso por la carga mecánica (17–20). También se han descrito como potentes inductores de la diferenciación otras sustancias como el fluoruro y el ácido retinoico (21,22).

1.1.1.3 Identificación

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

1.1.1.3.1. Identificación morfológica

El osteoblasto activo tiene forma cúbica o columnar con un núcleo localizado excéntricamente, un nucleolo voluminoso, citoplasma azulado y un halo citoplásmico perinuclear. Los osteoblastos contactan con sus osteoblastos vecinos citoplásmicamente a través de sus prolongaciones. Cuando las células comienzan a proliferar, su morfología cambia, presentándose fusiformes. Además, los osteoblastos muestran características morfológicas propias de las células que sintetizan proteínas, con un aparato de Golgi bien desarrollado localizado entre el núcleo y la base celular, mitocondrias alargadas y numerosas, y abundante retículo endoplásmico con cisternas dilatadas. Los osteoblastos también contienen cantidades significativas de actina, miosina y proteínas del citoesqueleto que permiten el mantenimiento de la forma de la célula y facilitan la movilidad y la unión celular. En ocasiones se observan gotitas lipídicas y cuerpos densos limitados por una membrana que al parecer son lisosomas. 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 desarrolla; disponiéndose en una capa epiteloide de células cuboides conectadas con otras, a través de expansiones finas y cortas.

Sin embargo, el osteoblasto inactivo tiene una forma aplanada con baja actividad de ALP (5,10,23,24).

1.1.1.3.2. Identificación bioquímica

Los osteoblastos secretan proteínas tanto colágenas como no colágenas sobre una base molar. Las proteínas no colágenas se clasifican en varias categorías, que incluyen proteoglicanos, proteínas glicosiladas, proteínas glicosiladas con posible actividad de unión a células y proteínas γ -carboxiladas (gla). Las funciones de cada una de las proteínas óseas varían desde la regulación de la deposición y el recambio mineral óseo hasta la regulación de la actividad de las células óseas (6).

La OSC es sintetizada por los osteoblastos y representa alrededor del 15% de las proteínas no colágenas de la matriz osteoide (25). Debido a que la OSC deriva tanto de la liberación de la matriz por la actividad de los osteoclastos como de la síntesis de los osteoblastos, actualmente se considera un marcador del recambio óseo en lugar de un marcador específico de formación ósea (6,26,27).

La proteína no colágena más prevalente en el hueso es la osteonectina (OSN), que representa aproximadamente el 2% de la proteína total en el hueso en desarrollo. Se cree que la OSN afecta el crecimiento y/o proliferación de los osteoblastos y a la mineralización de la matriz (6).

La principal proteína glicosilada que permite la caracterización bioquímica del osteoblasto es la ALP. Esta enzima puede presentarse en el hueso unida a la superficie de los osteoblastos a través de un enlace de fosfoinositol y también puede encontrarse libre dentro de la matriz mineralizada. En el proceso de mineralización, la alta actividad de ALP induce un aumento en la concentración local de calcio y fosfato (10).

Los osteoblastos maduros también producen reguladores de la mineralización de la matriz, como son las proteínas no colágenas osteopontina (OPN) y BSP, además del ligando del receptor activador para el factor nuclear κ B, más conocido como RANKL,

que es necesario para la diferenciación de los osteoclastos; así como, para el receptor de la PTH (PTHr1)(12,28,29).

La OPN es producida por los osteoblastos en diversas etapas de la diferenciación (30), por osteoblastos maduros, osteocitos (31,32) y también por osteoclastos (33). En el tejido óseo, la OPN podría tener al menos tres funciones: regulación de la adhesión de células óseas (34); regulación de la función de los osteoclastos (35,36) y regulación de la mineralización de la matriz (37,38).

El colágeno constituye una familia de proteínas presentes en la matriz extracelular de los tejidos conectivos. Está constituido por tres cadenas polipeptídicas (cadenas α) que forman una estructura de triple hélice. En los tejidos animales se pueden encontrar más de 27 formas de colágeno (39,40). El colágeno tipo I representa aproximadamente el 95% del contenido total de colágeno del hueso y en torno al 80% del total de proteínas presentes en el hueso (41). Esta proteína también permite caracterizar al osteoblasto ya que es producida por dichas células durante los últimos periodos de proliferación y los primeros periodos de maduración de la matriz (42).

1.1.1.3.3 Identificación antigénica

Los osteoblastos presentan un perfil antigénico específico que ayuda a su identificación y que está caracterizado por la expresión de antígenos presentes en otras células que también se origina en la médula (43).

El CD10 es una enzima metaloproteasa dependiente de zinc y con un peso molecular de 100 kDa, implicada en la eliminación e inactivación de ciertas hormonas peptídicas importantes para la transducción de señales, incluidas las encefalinas, la bombesina y la sustancia P (44). El CD10 se expresa en linfocitos tempranos B, pre-B,

pro-B, en el centro germinal de los ganglios linfáticos y en otros tipos celulares como fibroblastos, MSC, células epiteliales renales y células deciduales estromales, entre otros (45–47). Además de en estas poblaciones celulares, este antígeno de superficie también puede ser identificado en células osteoblásticas, no solo procedentes de cultivos humanos primarios, sino también en células osteoblásticas de osteosarcoma como la línea celular tipificada MG63, tal y como demostró nuestro grupo de investigación (43,48–50).

El CD44 es una glicoproteína presente en muchos tipos celulares que posee varias actividades fisiológicas, como la adhesión célula-célula y célula-matriz, la diferenciación hematopoyética, la modificación tisular, la actividad antiinflamatoria y funciones de carácter inmune (51–53). Participa en los procesos de transducción de señales, no solo mediante el establecimiento de complejos específicos transmembrana, sino también mediante la organización de cascadas de señalización gracias a la asociación con la actina del citoesqueleto. El CD44 y sus proteínas asociadas monitorean los cambios en la matriz extracelular que influyen en el crecimiento, la supervivencia y la diferenciación celular (54). La expresión de este marcador durante el proceso de diferenciación del osteoblasto aún no se conoce en profundidad. Algunos autores sugieren que el máximo nivel de expresión se encuentra en el osteocito mientras que otros lo han identificado en osteoblastos maduros (2,55).

Tanto la expresión de CD10 como de CD44 resulta positiva en el osteoblasto. Además, estas células expresan CD25, CD38 y CD69, antígenos cuya expresión no es específica de una determinada población celular (43,49).

Junto a los marcadores anteriormente señalados, indicar que el perfil antigénico del osteoblasto también se caracteriza por la expresión de marcadores propios de células inmunocompetentes (43,48,50,55):

- Los osteoblastos muestran expresión positiva para el CD54, CD80, CD86 y HLA-DR, marcadores propios de células implicadas en la presentación de antígenos y estimulación de la actividad de los linfocitos T. Este hecho refuerza la teoría de la vinculación existente entre el sistema inmune y el tejido óseo, pues estas moléculas son capaces de mantener la homeostasis del hueso controlando la osteoclastogénesis (56).
- Los osteoblastos también son positivos para el CD56, marcador de células Natural Killer (NK).
- En relación a la expresión de antígenos propios de células B, los osteoblastos expresan el CD20 y CD23, y son negativos para el CD19.
- Marcadores del linaje mielomonocítico como el CD11b, CD13 y CD16, son detectados en el osteoblasto; sin embargo, no expresan los antígenos CD14, CD15, CD33 y CD68.
- Igualmente se ha descrito la capacidad del osteoblastos para expresar el antígeno específico de las células foliculares dendríticas (FCD y DRC-1)(43,55)

Entre los antígenos que son expresados típicamente 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, cuya expresión varía según la línea celular y el anticuerpo monoclonal (Abmo) utilizado. Sin embargo, la expresión de CD45, antígeno asociado a otras células de origen hematopoyético, resulta ser negativa en el osteoblasto (43).

La expresión de estos marcadores no es siempre constante, pudiendo verse modificada por el grado de maduración celular o por la presencia de distintas moléculas,

tales como factores de crecimiento y citoquinas en general, como en el caso de CD54, CD80, CD86 y HLA-DR. Sin embargo, otros antígenos se muestran invariables y están siempre presentes en el osteoblasto, lo que sugiere la existencia de un pull de antígenos constitutivos y antígenos modulables, cuya expresión puede variar bajo diversas circunstancias, fisiológicas y no fisiológicas (50,57–60).

1.1.1.3.4 Identificación génica

Los cultivos primarios tienen una importante limitación relacionada con el hecho de que contienen mezclas de células osteoblásticas en diferentes etapas y células que, si comparten un precursor común, están involucradas en otros linajes. Así, muy pocos genes expresados por osteoblastos pueden considerarse exclusivos del hueso, con la posible excepción de la OSC, un gen expresado específicamente por osteoblastos totalmente diferenciados (61).

La osteogénesis es un proceso controlado por numerosos factores extrínsecos que activan las proteínas de señalización específicas de los osteoblastos y los factores de transcripción necesarios para la diferenciación de los mismos, siendo uno de los más importantes el factor de unión al núcleo alfa 1 (Cbfa1), también llamado Runx2. En el osteoblasto, el Runx2 actúa como el factor nuclear que se une al elemento específico 2 del osteoblasto (OSE2), un elemento de acción cis localizado en el promotor de la OSC, activándola (62). Este factor de transcripción se expresa en todos los osteoblastos, independientemente de su origen embrionario y del modo de osificación, y representa el evento de unificación más temprano entre los elementos esqueléticos. La expresión de Runx2 está restringida únicamente a estructuras esqueléticas. Ningún tejido blando expresa el gen en niveles detectables (63). Estudios previos han descrito en animales de

21

experimentación que los ratones con déficit de *Runx2* presentan un lapso en la formación ósea debido a una detención de la maduración de los osteoblastos, lo que muestra que el *Runx2* es necesario para la osteogénesis (64,65). Las señales que regulan la expresión *Runx2* no están completamente definidas, si bien ha sido identificado que miembros de la familia del TGF β , incluidas las BMP-2, BMP-4 y BMP-7, regulan positivamente su expresión (66).

Junto a la OSC y al *Runx2*, existen una serie de proteínas propias del proceso de diferenciación que pueden igualmente considerarse "marcadores de osteoblastos". Así, aproximadamente a los 14 días de iniciarse la diferenciación de las MSC al linaje osteoblástico, los principales marcadores detectados incluyen ALP, OSC y galectina-3. Igualmente, entre los genes asociados a las vías osteoblásticas destacan: la decorina y proteína de la matriz (MGP) moderadamente expresadas entre los días 14 y 21, el Col I ($\alpha 1$ y 2), con una expresión más marcada en el día 21. La fibronectina, la fibromodulina, el CD44 y las trombospondinas (genes 1-4) se expresan en niveles altos en todos los puntos de la maduración osteoblástica, al igual que ocurre con los Col tipo 5 ($\alpha 1$ y 2) y 6 ($\alpha 1$), y tres marcadores óseos como el receptor c-fos, *Runx2* y PTH / Proteína relacionada con la PTH (PTHrP) (67).

La BSP y la OPN, dos proteínas matriciales, son consideradas marcadores de maduración osteoblástica tardía (68). Sin embargo, también son detectadas en etapas más tempranas en el proceso de diferenciación, alcanzando máximos niveles de expresión a los 7 y 14 días respectivamente (67).

1.1.1.4 Funciones del osteoblasto

Síntesis de la matriz ósea

La principal función del osteoblasto es la formación de la matriz ósea y la regulación de la mineralización de la misma mediante la liberación de vesículas, cuyo contenido rico en calcio y fosfato, contribuye a la destrucción enzimática de inhibidores de mineralización como pirofosfato o proteoglicanos (69).

La síntesis de la matriz ósea se organiza en dos etapas: la formación de la matriz orgánica y la mineralización de la misma. La formación de la matriz orgánica está mediada por la secreción de diversas moléculas por parte del osteoblasto como son proteínas colágenas, principalmente Col I; proteínas no colágenas (OSC, OSN, BSP II y OPN) y proteoglicanos (incluyendo decorina y biglicano) que constituyen dicha matriz, también conocida como matriz osteoide. Una vez se ha conformado el osteoide, se inicia el proceso de mineralización, que se organiza en dos etapas, y que concluye con la formación de cristales de hidroxapatita confiriendo al hueso su estructura rígida y resistente (69–71).

Regulación de la osteoclastogénesis

El mantenimiento de la masa ósea depende del correcto equilibrio entre los procesos de formación y resorción de hueso. Este balance entre ambos procesos no solo depende de factores sistémicos, sino también de una correcta comunicación entre las células que crean y destruyen el tejido óseo (72,73).

La regulación de la osteoclastogénesis por parte de los osteoblastos es posible gracias a la acción paracrina de estos últimos, capaces de influir sobre la actividad osteoclástica a través de la secreción de diversas moléculas. El factor estimulante de

colonias de macrófagos (M-CSF) es una citoquina producida por los osteoblastos que interactúa con su receptor c-Fms expresado en la superficie de los pre-osteoclastos, promoviendo así su proliferación y diferenciación (74). Igualmente, la interacción entre el RANKL, también sintetizado por los osteoblastos, y su receptor, expresado por los precursores osteoclásticos favorece su diferenciación a osteoclastos maduros (75,76).

La PTHrP, la IL-1 β , IL-6 y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) son otros factores paracrinicos sintetizados por el osteoblasto que también intervienen en la regulación de la actividad de los osteoclastos (77).

Funciones endocrinas

Recientes estudios han demostrado que el hueso también puede comportarse como un órgano endocrino gracias a la secreción de moléculas que se comportan como auténticas hormonas. Es el caso de la FGF23, sintetizada por los osteocitos y responsable del mantenimiento de la homeostasis del fosfato (78). La OSC es una proteína no colágena expresada tanto por los osteoblastos como por los osteocitos. Cuando la OSC se encuentra descarboxilada ejerce su papel endocrino, presentando una elevada afinidad por el páncreas, los testículos y el tejido adiposo. Así, cuando actúa sobre el páncreas, esta proteína es capaz de regular el metabolismo de la insulina y los niveles de glucosa en sangre (79–81). En el tejido adiposo, la OSC regula la expresión de adiponectina, incrementando la sensibilidad a la insulina (82). Finalmente, en los testículos la OSC se une al receptor específico acoplado a la proteína G, desencadenando una señal que promueve la síntesis de testosterona (83).

Otras funciones del osteoblasto

Además de las funciones descritas anteriormente, el osteoblasto desempeña actividades de carácter inmunitario como la capacidad fagocítica, la estimulación de los linfocitos T o la síntesis de citoquinas (63,84–86). La expresión de antígenos relacionados con la presentación antigénica también ha sido descrita en osteoblastos, lo que sugiere que estas células son capaces de actuar como células presentadoras de antígeno e interactuar de forma recíproca con los linfocitos T (85).

Recientes investigaciones han atribuido a un subconjunto de osteoblastos, conocidos como Osteoblastos N-cadherina + / CD45 con forma de husillo, la capacidad de regular las poblaciones de células madre hematopoyéticas. Esta acción fue también evidenciada por Kode et al, (2014) quienes demostraron que la activación de la β -catenina en los osteoblastos era capaz de inducir leucemia mieloide aguda, junto con la inestabilidad del genoma y las mutaciones cromosómicas en las células madre hematopoyéticas (87–89).

1.1.2. Osteocitos

Los osteocitos son las células más abundantes del tejido óseo. Representan entre el 90-95% del componente celular del hueso (90). Derivan de MSC tras su diferenciación a osteoblastos. Los osteocitos se encuentran embebidos en la matriz ósea mineralizada donde presentan una morfología dendrítica, con prolongaciones citoplasmáticas formando una extensa red canalicular que permiten la comunicación con las células de revestimiento de la superficie ósea, osteoblastos y con otros osteocitos (91,92). Sin embargo, su forma puede cambiar según su localización, siendo más redondeadas cuando se encuentran en el hueso trabecular y más alargadas en el hueso cortical (93).

La principal función de los osteocitos está relacionada con la mecanosensibilidad. Gracias a su privilegiada situación en el hueso, estas células son capaces de convertir estímulos mecánicos en actividad biológica (efecto piezoeléctrico) a través de diversos mecanismos que implican moléculas como PGE2, ciclooxigenasa 2, diversas quinasas, Runx2 y óxido nítrico (94–97). Además, los osteocitos se encargan del mantenimiento de la matriz ósea mineralizada y de la homeostasis del calcio, pudiendo incluso inducir la resorción del hueso por acción de la PTH (6). También se ha descrito el papel de estas células sobre el sistema endocrino, pues son capaces de regular la linfopoyesis y, en consecuencia, el sistema inmune, mediante una modificación del microambiente en los órganos linfoides primarios (98).

1.1.3. Osteoclastos

Los osteoclastos son células multinucleadas que se localizan en depresiones de la superficie ósea conocidas como lagunas de Howship. Se originan a partir de células mononucleares del linaje de células madre hematopoyéticas (99), bajo la influencia de varias citoquinas como el MCSF, secretadas por células osteoprogenitoras y por los osteoblastos (100), y el RANKL, secretado por osteoblastos, osteocitos y células estromales (101). La regulación de la actividad de estas células depende de gran cantidad de factores y citoquinas como RANKL, OPG, IL-1, IL-6, PTH, 1,25-dihidroxitamina D y calcitonina (6,99,102). Estos factores promueven la activación de factores de transcripción y la expresión génica en los osteoclastos (75,100).

Durante el remodelado óseo, los osteoclastos son las células responsables de la resorción del hueso (103). Esta degradación del tejido óseo se produce en dos fases y depende de la capacidad de estas células para secretar iones de hidrógeno y catepsina K.

En primer lugar, los iones H^+ acidifican el compartimento que debe ser destruido debajo de los osteoclastos disolviendo el componente mineral de la matriz ósea. Posteriormente, la catepsina K digiere la matriz proteínica, que está compuesta principalmente de Col I (99).

1.2. Matriz ósea

La matriz ósea representa el 90% del volumen total de hueso. Se compone de cuatro elementos principales: matriz mineral o inorgánica (70%), matriz orgánica (20%), lípidos (<3%) y agua (5-10%). Los elementos que componen dicha matriz se combinan formando un andamiaje característico que dota al hueso de la rigidez y resistencia típicas de este tejido (104).

1.2.1. Matriz inorgánica

La matriz mineral o inorgánica se compone principalmente de iones de fosfato y calcio (Ca) que se combinan para formar cristales de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ de pequeño tamaño, más solubles que la hidroxiapatita geológica, lo que favorece el metabolismo óseo. En ella también se pueden encontrar cantidades significativas de bicarbonato, sodio, potasio, citrato, magnesio, carbonato, fluorita, zinc, bario y estroncio (5,105). La matriz inorgánica representa la principal fuente de Ca y fósforo del organismo. Además, el 90% del sodio y el 50% del magnesio disponible en el cuerpo humano, se almacenan en el hueso. Esta composición dota al mismo de su fuerza, rigidez y resistencia frente a las fuerzas tensionales (5).

1.2.2. Matriz orgánica

La matriz orgánica se compone principalmente de proteínas colágenas (90%), predominantemente Col I, proteínas no colágenas, factores de crecimiento y proteoglicanos (106,107).

Colágeno

Existen más de 27 tipos de colágeno presentes en los distintos tejidos del organismo. El colágeno, principalmente, tipo I y pequeñas reminiscencias del III, V y del XII constituyen el 90% de la matriz orgánica (108,109).

El colágeno es una proteína multidominio constituida por tres cadenas polipeptídicas alfa que se entrecruzan y se unen mediante puentes de hidrógeno, formando una estructura en α hélice enrollada. Cada cadena se conforma de unos 1000 aminoácidos, siendo característica la presencia de glicina en cada tercera posición a lo largo del polipéptido y un alto contenido de iminoácidos, como prolina e hidroxiprolina modificada postraduccionalmente (110,111).

El Col I dota al hueso de sus propiedades mecánicas. Desempeña un papel esencial sobre la tenacidad o capacidad del hueso para absorber la energía (109).

Sustancia fundamental

Además de colágeno, la matriz orgánica se compone de proteínas no colágenas, proteoglicanos y factores de crecimiento.

Proteínas no colágenas

Las proteínas no colágenas pueden intervenir en la conformación y mineralización del hueso, al favorecer la ordenada deposición de minerales mediante la regulación de la

cantidad y el tamaño de los cristales de hidroxiapatita formados. Están representadas por la OSC, OPN, BSP, fibronectina, fosfoproteínas, trombospondina, entre otras (5,6).

La OSC es una proteína gamma carboxilada. *In vitro*, es capaz de inhibir la formación de cristales de fosfato cálcico (112). Sin embargo, *in vivo* su principal función reside en el control de la síntesis de la matriz (25).

La OPN, fibronectina, la trombospondina y la BSP son proteínas de adhesión celular. La OPN, al igual que la OSC, inhibe el crecimiento de los cristales de hidroxiapatita (113). Además, es indispensable para la correcta actividad de las células destructoras del tejido óseo, pues actúa de anclaje entre los osteoclastos y la matriz ósea (36). La BSP es una glicoproteína ácida capaz de inducir la nucleación de cristales de hidroxiapatita *in vitro* (38). Además, puede unirse al colágeno potenciando la calcificación de la matriz (114).

Por otro lado, las fosfoproteínas parecen estar implicadas en el inicio de la calcificación de la matriz orgánica (115).

Proteoglicanos

Los proteoglicanos presentes en la matriz se caracterizan por ser ricos en leucina y destacan la decorina, biglicano, lumican, osteoadherina y proteína sérica (116).

Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento que componen la matriz orgánica son las BMP, factores de la familia del TGF β , IL1, IL6, IGF 1 y 2, PDGF y CSF, entre otros (5,117).

Numerosos estudios parecen indicar que estos factores de crecimiento están estrechamente relacionados con los procesos de osteogénesis, mineralización y remodelación del hueso al modular la actividad de hormonas sistémicas que actúan sobre factores locales implicados en dichos procesos (117,118).

1.3. Formación del tejido óseo

La formación del hueso es un proceso complejo que puede desarrollarse de acuerdo a dos mecanismos:

- a) Osificación endocondral: se caracteriza principalmente porque la formación del hueso está mediada por cartílago. Se inicia con la proliferación de los condrocitos, que se hipertrofian y liberan ALP. Cuando sobreviene la muerte celular, los condrocitos liberan factores angiogénicos que incluyen el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el cual favorece la irrigación de la zona donde yacen los condrocitos y la llegada de células osteoprogenitoras, que, al diferenciarse, darán lugar a células formadoras de hueso. La osificación endocondral es característica de los huesos largos.
- b) Osificación intramembranosa: está mediada por la capa osteogénica periosteal interna y se caracteriza por la formación espontánea de hueso sin la presencia previa de cartílago. En ella, se constituye un centro de osificación en la matriz extracelular por diferenciación de células madre mesenquimales en células osteoprogenitoras que proliferan y se diferencian a osteoblastos. Los huesos planos, los que conforman la bóveda craneal y los de la mandíbula se originan a través de este tipo de osificación (119–121).

1.4. Remodelado óseo

El hueso es un tejido dinámico que está en permanente cambio a lo largo de la vida. El remodelado óseo es un proceso que resulta de la actividad sincrónica de los osteoblastos y osteoclastos, que en su conjunto constituyen lo que se conoce como unidad multicelular básica (BMU)(122). La BMU se compone de un grupo de los osteoclastos que forman por delante el cono de corte y un grupo de osteoblastos por detrás formando el cono de cierre, asociado con los vasos sanguíneos y la inervación periférica (72).

El proceso de remodelado óseo se estructura en tres fases: fase de resorción, fase reversa y fase de formación (123).

Fase de Resorción: la activación del remodelado óseo está estimulada inicialmente por la PTH, que favorece el desplazamiento y diferenciación de los preosteoclastos parcialmente diferenciados a la superficie del hueso que debe ser degradada bajo la influencia de factores osteoclastogénicos como el RANKL, M-CSF y el factor quimiotáctico de monocitos (MCP-1)(124,125). Estas células son las responsables de la resorción del tejido óseo por procesos de acidificación y proteólisis de la matriz ósea y de los cristales de hidroxapatita, que son procesados mediante la digestión de su enlace con el colágeno, formando una depresión conocida como laguna de Howship (126,127).

Fase reversa: una vez completada la fase de resorción del tejido óseo se entra en una fase de transición o fase reversa caracterizada por la presencia de células mononucleares o “lining cells”, que digieren las fibras de colágeno residuales presentes en las lagunas de Howship mediante catepsinas o colagenasas activadas, y preparan la superficie ósea para los osteoblastos, estimulando su migración y diferenciación (128).

Fase de formación: la formación del tejido óseo es responsabilidad de los osteoblastos y se organiza en 2 etapas: la formación y maduración de la matriz osteoide y la mineralización de la misma. La fase de formación concluye cuando toda la cavidad ósea formada por los osteoclastos es sustituida por tejido óseo nuevo. Cuando se completa esta fase, la superficie se cubre con células de revestimiento aplanadas y comienza un período de descanso prolongado hasta que se inicia un nuevo ciclo de remodelación. Inicialmente se pensó que el IGF I y II y TGF β activo parecen ser la señal clave para el reclutamiento de MSC en sitios de resorción ósea (129). Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado la capacidad de los osteoclastos para sintetizar factores, como esfingosina 1-fosfato y el complejo de señalización bidireccional EphB4 · ephrin-B2, capaces de atraer a las MSC hacia la región donde debe producirse la formación de nuevo tejido (130).

El remodelado óseo se fundamenta en un equilibrio entre los procesos de formación y destrucción del hueso. Por ello resulta indispensable una correcta comunicación entre los osteoblastos y los osteoclastos que es conocida con el nombre de mecanismo de acoplamiento. Este sistema comunicativo se encuentra regulado por diversos factores liberados por los osteoblastos, como los IGF, TGF β , BMP, FGF y PDGF durante la fase resorptiva (129,131). Pero recientemente se ha descubierto la capacidad de los osteoclastos para regular este procesos a través de la síntesis de diversas moléculas como las semaforinas, implicadas en la inhibición de la formación de hueso (132), la esfingosina 1-fosfato, que induce el reclutamiento de precursores osteoblásticos (133) u otros factores como el ephrinB2 cuya unión a la ephrinB4 estimula la diferenciación del osteoblasto, activándose la osteoclastogénesis cuando la unión de ambas moléculas es inversa (ephrinB4/ephrinB2)(130). Sin embargo, es el sistema OPG/RANKL/RANK el principal complejo responsable del control y regulación del

remodelado óseo. El RANKL pertenece a la familia del ligando de TNF. Se expresa fundamentalmente en la superficie de MSC, preosteoblastos y células T. La unión entre el RANKL y su receptor RANK, expresado por las células precursoras osteoclasticas, estimula la activación y diferenciación del osteoclasto fomentado de este modo la resorción del hueso. La OPG es capaz de bloquear este complejo inhibiendo la diferenciación y la función de los osteoclastos, pues tiene la capacidad de interactuar con el RANKL evitando su unión al RANK (123,134). Este sistema a su vez, se encuentra regulado por otras moléculas como M-CSF, esenciales para el desarrollo del osteoclasto, por citoquinas preresorptivas como $TNF\alpha$, IL1 (135) o $TGF\beta$ y por hormonas como la PTH (136), dihidroxivitamina D3(137), glucocorticoides (138) y estrógenos (139).

2. DIETA MEDITERRÁNEA

El concepto de dieta mediterránea (DM) fue acuñado en 1993 en la Conferencia Internacional sobre las Dietas del Mediterráneo, como aquel patrón dietético propio de las regiones olivareras de los años 60, próximas al Mediterráneo, y caracterizado por un elevado consumo de aceite de oliva, de legumbres, de cereales no refinados, de frutas y vegetales; consumo moderado de productos lácteos, como queso y yogures; consumo moderado-alto de pescado; bajo consumo de carne y productos cárnicos y el consumo moderado de vino (140). Numerosos estudios abogan por la implementación de este tipo de dieta pues se asocia a un menor riesgo de mortalidad global (141), diabetes (142) enfermedades cardiovasculares (143), entre otras.

2.2 Aceite de oliva virgen extra

Para favorecer la formación de hueso nuevo es necesaria una ingesta adecuada de nutrientes y minerales como el calcio y la vitamina D (144), aunque no son los únicos factores implicados en este proceso ya que el metabolismo óseo está regulado por interacciones entre el potencial genético del individuo, el ambiente y, por supuesto, por los factores nutricionales (145). Uno de estos elementos nutricionales es el aceite de oliva virgen extra (AOVE), que representa la principal fuente de lípidos de la DM debido a su elevada calidad nutricional y sus efectos beneficiosos sobre la salud de los consumidores (140,146).

El AOVE, es el único jugo de la aceituna obtenido por prensado y uno de los pocos aceites que se consume sin ningún otro proceso de refinado (147).

2.2.2 Composición

El AOVE se compone de triacilglicerolés principalmente (~98%), ácidos grasos, mono y diacilglicerolés. Los compuestos menores del aceite representan el 2% del total de su peso e incluyen más de 230 compuestos entre los que destacan los hidrocarburos, esterolés, alcoholés alifáticos, tocoferolés, pigmentos, compuestos volátiles y los compuestos fenólicos (148,149)

2.2.2.1 Ácidos grasos, triacilglicerolés y glicerolés parciales

Los principales ácidos grasos identificados en el AOVE incluyen el ácido palmítico, palmitoleico, ácido esteárico, oleico, linoleico y linolénico; y en menor medida el ácido mirístico, heptadecanoico y eicosanoico. Los aceites de oliva griegos, italianos y

españoles son bajos en ácidos linoleico y palmítico y tienen una mayor composición en ácido oleico (150,151).

En cuanto a los triacilgliceroles, el AOVE se compone en un 40-59% de OOO y en menor medida de POO (12-20%), OOL (12.5-20%), POL (5.5-7%) y SOO (3-7%). También se pueden encontrar trazas de POP, POS, OLnL, LOL, OLnO, PLL, PLnO y LLL (152). (E = ácido esteárico, L = ácido linoleico, O = ácido oleico, P = ácido palmítico; S= ácido esteárico, Ln= ácido linoléico)

Los gliceroles parciales del aceite pueden originarse bien por la síntesis incompleta de triacilgliceroles o por procesos de hidrólisis. Los diacilgliceroles representan entre el 1 y el 2,8%, mientras que los monoacilgliceroles rondan el 0,25%. Estos niveles varían según el grado de acidez del aceite y de las condiciones de conservación (153,154).

2.2.2.2 Hidrocarburos

El escualeno y los β - carotenos son las especies de hidrocarburos presentes en mayor cantidad en el aceite. El escualeno es el principal intermediario en la síntesis del colesterol y es ampliamente conocido por sus propiedades anticancerígenas (155,156). Además de estos compuestos, la fracción de hidrocarburo del AOVE se compone de hidrocarburos diterpénicos y triterpénicos, poliolefinas isoprenoidales y parafinas (157).

2.2.2.3 Tocoferoles

El 95% de los tocoferoles identificados en el AOVE vienen representados por el α tocoferol y pequeñas reminiscencias de γ y β tocoferol (158). Los tocoferoles, más

conocidos como vitamina E, tienen actividad antioxidante y pro-oxidante según las condiciones de almacenamiento del aceite (159).

2.2.2.4 Pigmentos

La coloración característica del aceite es debida a la acción de los pigmentos que lo componen, principalmente la clorofila y los carotenoides. La clorofila es responsable del color verdoso del aceite (160). Dentro de este grupo destaca la feofitina α por ser la más predominante (161), aunque también se encuentran en menor cantidad la clorofila a, de color verde azulado y la clorofila b, de color verde amarillento, cuyo ratio oscila entre 6 y 8 (162), las clorofilidas, feofórbidas, pirofofetinas, cloro, rodinas y purpurinas (160).

Los carotenoides le confieren al aceite un tinte amarillento. Los más abundantes en el aceite son la luteína y los β -carotenos (163). La fracción de carotenoides también puede incluir varias xantofilas (violaxantina, neoxantina, luteoxantina, antheraxantina, mutatoxantina y β -criptoxantina)(160).

2.2.2.5 Alcoholes alifáticos y aromáticos

Los alcoholes alifáticos más importantes del aceite son los alcoholes grasos y los alcoholes diterpenos. Los alcoholes grasos que más abundan en el aceite son el docosanol, tetracosanol, hexacosanol y octacosanol. Numerosos estudios han demostrado el efecto beneficioso que estos alcoholes grasos de cadena larga ejercen sobre la salud (164,165). Entre los alcoholes diterpenos más destacados en el aceite cabe nombrar el fitol y el geranilgeraniol que son dos alcoholes diterpenos acíclicos (166).

2.2.2.6 Esteroles

Los esteroles presentes en el AOVE se organizan en 3 grupos (149,167):

- Esteroles comunes: Entre ellos se destacan el β -sitosterol, Δ 5-avenasterol y campesterol y en menor cantidad el estigmasterol, colesterol, brassicasterol, clesterol, ergosterol, sitostanol, campestanol, Δ 7-avenasterol, Δ 7-colestenol, Δ 7-campestenol, Δ 7-estigmastenol, Δ 5,23-estigmastadienol, Δ 5,24-estigmastadienol, Δ 7,22-ergostadienol, Δ 7,24-ergostadienol, 24-metilencolesterol y 22,23-dihidrobrassicasterol.
- Metilesteroles: Predominan el obtusifoliol, gramisterol, cicloeucalenol y citrostadienol.
- Alcoholes triterpénicos: Los principales componentes de esta fracción son la β -amirina, butirospermol, 24-metilencicloartanol y cicloartenol.

2.2.2.7 Ácido triterpénicos

Son compuestos biológicamente activos y están presentes en pequeñas cantidades en el aceite de oliva. El ácido oleanólico, el ácido maslínico, el eritrodiol y el uvaol son los principales ácidos triterpénicos presentes en el AOVE (168).

2.2.2.8 Compuestos volátiles

Los compuestos volátiles son los principales responsables de las propiedades aromáticas que posee el aceite. Los compuestos C5 y C6 y especialmente los aldehídos lineales insaturados y saturados C6 representan la fracción más importante de compuestos volátiles del aceite (169). También se pueden encontrar, aunque en menor porcentaje,

aldehídos monoinsaturados C7-C11 o dienales C6-C10, aldehídos y alcoholes ramificados C5 y algunas cetonas C8 (170,171).

2.2.2.9 Compuestos fenólicos

Gran parte de los beneficios que el AOVE ejerce sobre la salud son debidos al importante potencial antioxidante de los compuestos fenólicos. Actúan como rompedores de cadena al donar radicales de hidrógeno a radicales alquilperoxilo, producidos por oxidación de lípidos y la formación de derivados estables durante la reacción (172,173). Estas propiedades los han situado en el foco de mira como objetivos nutraceuticos para la industria alimentaria y farmacéutica, al presentarse como posibles agentes preventivos de enfermedades crónicas y degenerativas, así como patologías relacionadas con los procesos de estrés oxidativo (174).

En general, el AOVE contiene 5 clases principales de compuestos fenólicos: flavonoides, lignanos, ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos y secoiridoides

Los principales polifenoles presentes en la aceituna son los ácidos fenólicos, los alcoholes fenólicos, los flavonoides y los secoiridoides. Mientras que los ácidos fenólicos, los alcoholes fenólicos y los flavonoides se encuentran en muchas frutas y verduras de diversas familias botánicas, los secoiridoides están presentes exclusivamente en plantas pertenecientes a la familia *Oleaceae* que incluyen la *Olea europaea L.* (olivo o aceituno) (175).

La composición en compuestos fenólicos del AOVE puede variar en cantidad (150-700 mg / L) y calidad, dependiendo de la variedad de aceituna, el grado de maduración, la composición del suelo, el clima, las técnicas de recolección, procesamiento y el almacenamiento (176-178).

Flavonoides

Los flavonoides más comunes incluyen glucósidos de flavonol tales como: gluteolina-7-glucósido y rutina, luteolina, apigenina así como antocianinas, cianidina y glucósidos de delphinidina (179).

Secoiridoides

Los secoiridoides se caracterizan por la presencia de cualquiera de los derivados del ácido elenólico en su estructura molecular. Oleuropeína, dimetiloleuropeina, ligstroside y nüzhenide son los secoiridoides más abundantes en la aceituna. La Oleuropeina, dimetiloleuropeina y el verbascoside están presentes en la cáscara, la pulpa y la semilla. Sin embargo, la nüzhenide, se encuentra únicamente en la semilla.

Por su parte la oleaceína y el oleocantal son los secoiridoides más abundantes del AOVE (180,181).

Lignanos

Los lignanos como el pinoresinol, el acetoxipinoresinol y el hidroxipinore- sinol están presentes en cantidades más significativas (147).

Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos con la estructura química de ácido benzoico y ácido cinámico también se encuentran en las aceitunas (182). Estos compuestos, como cafeico, vanílico, siringico, p-cumárico, o- cumárico protocatéquico, sinapina, p-hidroxibenzoico y ácido gálico fueron el primer grupo de compuestos fenólicos identificados en el AOVE (183,184).

Alcoholes fenólicos

El hidroxitirosol y el tirosol son los principales alcoholes fenólicos en el AOVE (185). Aunque su concentración es generalmente baja en aceites frescos aumenta durante el almacenamiento del producto (186).

2.2.3 Beneficios del aceite sobre la salud

El AOVE es la principal grasa de la DM y a él se atribuyen muchos de los beneficios que este tipo de patrón dietético ejerce sobre la salud. El consumo regular de aceite se ha asociado con un menor riesgo de sufrir distintas patologías (187,188).

2.2.3.1 Aceite y enfermedades cardiovasculares

Estudios epidemiológicos recientes han demostrado el efecto protector del AOVE sobre la enfermedad coronaria, tal y como muestra el estudio EPIC-España. Esta investigación puso de manifiesto que el consumo de aceite se relaciona inversamente con los eventos de enfermedad coronaria, reduce el riesgo de sufrir esta patología y el riesgo de mortalidad asociada (189).

El mecanismo de acción por el que el aceite actúa sobre los procesos cardiovasculares parece estar relacionado con su capacidad de mejorar la presión arterial, el control glucémico en diabéticos, la función endotelial, el estrés oxidativo y los perfiles lipídicos, disminuyendo los triglicéridos y el colesterol total y LDL, y aumentando el colesterol HDL (190–192).

2.2.3.2 Aceite y diabetes, síndrome metabólico y obesidad

El estudio PREDIMED reveló que una alimentación basada en la DM y suplementada con AOVE se asocia con una reducción del 40% de la incidencia de diabetes mellitus (142). Este estudio corroboró que una dieta rica en AOVE puede mejorar el metabolismo de la glucosa y reducir el peso corporal. Además, el aceite es capaz de actuar sobre diferentes factores relacionados con el síndrome metabólico, mejorando la presión arterial, la resistencia a la insulina y los perfiles lipídicos (193). En esta línea, el estudio Di@abet.net demostró que el consumo de aceite de oliva se asocia con un menor riesgo de desarrollar obesidad, alteración del metabolismo de la glucosa, hipertrigliceridemia y menor nivel de colesterol HDL (194).

Estudios *in vivo*, pusieron de manifiesto que distintos compuestos del aceite como el hidroxitirosol, la oleuropeina, el escualeno o el ácido oleanólico eran capaces de reducir el peso de ratas obesas cuando eran alimentadas con dichos compuestos (195–198).

Estos efectos podrían ser explicados debido a la capacidad de ciertos componentes del AOVE, como los ácidos grasos monoinsaturados, para mejorar el metabolismo de la glucosa y aumentar la oxidación de grasa posprandial y la termogénesis inducida por la dieta (199).

2.2.3.3 Aceite de oliva y cáncer

La actividad quimiopreventiva del AOVE ha sido ampliamente estudiada. La revisión llevada a cabo por Psaltopoulo (2011) (200) evidenció el efecto beneficioso del aceite en esta patología. En este trabajo se puso de manifiesto que aquellos pacientes cuyo consumo de AOVE era más elevado tenían un 34% menos de probabilidades de sufrir cualquier tipo de cáncer.

Cáncer de mama

En la actualidad numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* respaldan el hecho de que, además de los ácidos grasos monoinsaturados, los compuestos fenólicos del AOVE también poseen un efecto quimioterápico sobre el cáncer. Así lo demostraron en su estudio Han et al. (2009) (175). Dichos autores muestran que el hidroxitirosol y la oleuropeína son capaces de reducir la proliferación de células de cáncer de mama de la línea MCF7 como consecuencia de la activación de la vía apoptótica. Otros estudios establecen como mecanismos de acción la capacidad de los polifenoles para interferir en el metabolismo de los estrógenos, ampliamente implicados en el desarrollo del tejido mamario (201,202).

Cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal está estrechamente vinculado a los hábitos alimenticios. Tanto es así, que los países del área mediterránea presentan tasas inferiores de esta enfermedad en relación a aquellos países no adheridos a este patrón nutricional. La aportación del aceite a la prevención de este tipo de cáncer se relaciona con su composición en compuestos fenólicos. Estos son capaces de inhibir los procesos carcinogénicos del colon, desde el inicio, promoción y metástasis, desencadenando la muerte celular por apoptosis (203–205).

A pesar de los buenos resultados obtenidos *in vitro*, en humanos la evidencia no parece ser tan concluyente. Aunque Braga et al. (1998) (206) encontraron una asociación significativa inversamente proporcional entre el consumo de aceite y el cáncer colorrectal, la mayor parte de los estudios llevados a cabo en humanos no han encontrado ninguna

asociación o esta no resulta ser significativa (207)(falta referencia de los contrario a los resultados de Braga et al a los que haces mención).

Otros tipos de cáncer

Varios estudios realizados en diferentes zonas del continente europeo encontraron asociaciones inversamente proporcionales entre el aceite de oliva y diversos cánceres del tracto digestivo (desde la boca hasta el esófago) con una reducción del riesgo que oscilaba entre el 22-74% en relación al menor/mayor consumo de aceite respectivamente (200,208).

En el caso de la leucemia, los compuestos fenólicos del aceite y especialmente el hidroxitirosol ejercen, *in vitro*, un efecto quimioterápico al inhibir el ciclo celular, reduciendo el crecimiento y la proliferación e induciendo la apoptosis de las células tumorales (209–211).

2.2.3.4 Aceite de oliva y patología ósea

En la actualidad se ha demostrado la capacidad del AOVE para actuar sobre la fisiología del hueso, perfilándose como una herramienta terapéutica en el manejo de las patologías óseas de distinta índole (212).

Artritis reumatoide

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune caracterizada por una inflamación sinovial, con afectación del cartílago y daño óseo (213). El estímulo autoinmune inicial es desconocido; sin embargo, uno de los mecanismos implicados en el daño articular y tisular involucra a las especies reactivas de oxígeno (ROS). La

capacidad antiinflamatoria y antioxidante de los compuestos fenólicos está ampliamente descrita en la literatura científica, por lo que el efecto beneficioso que ejercen estos compuestos sobre la degradación del cartílago y el daño óseo podría ser explicado en base a una reducción de los niveles de citoquinas proinflamatorias y prostaglandina E2 en la articulación; así como, la expresión de la ciclooxigenasa-2 junto a una reducción de la translocación del factor nuclear κ B, lo que conduce a la baja regulación del proceso artrítico (214–216). Otras líneas sugieren que los cambios sobre el sistema inmune provocados por el aceite de oliva podrían dar respuesta a los mecanismos de acción que están detrás de su efecto sobre este proceso autoinmune (217).

Osteoporosis

La alimentación es uno de los factores modificables implicados en el metabolismo del hueso. Varios estudios han concluido que la incidencia de osteoporosis y fracturas relacionadas con la osteoporosis varía según la región de la Unión Europea, encontrándose la incidencia más baja en el área mediterránea, lo que se relaciona directamente con la composición de este patrón nutricional (218). En este sentido, Fernández-Real et al. (2012) (219) observaron que el seguimiento de la DM suplementada con AOVE se asociaba con un incremento de la expresión de marcadores de formación ósea, como la OSC. Igualmente, diversos ensayos clínicos han demostrado el potencial efecto protector del AOVE, y especialmente de los ácidos grasos monoinsaturados, sobre la densidad mineral ósea (220–222). Estudios *in vivo*, como los desarrollados por Liu et al. (2014) (223) establecieron que la suplementación con aceite de oliva mejoraba la densidad mineral ósea en columna y fémur de ratas ovariectomizadas, probablemente al reducir el estrés oxidativo. Resultados similares fueron hallados por Saleh y Saleh (2011)

44

(224) que observaron una mejoraría, a nivel de los marcadores de estrés oxidativo, como el ácido nítrico o el malondialdehído, los cuales han sido directamente implicados en la pérdida de masa ósea, y de la debilidad del hueso trabecular y cortical.

Aunque los triglicéridos representan el principal elemento constitutivo del AOVE, numerosos efectos beneficiosos del aceite sobre el tejido óseo han sido relacionados con su composición en compuestos fenólicos. Se ha demostrado que ciertos compuestos fenólicos presentes en el aceite pueden modular la densidad mineral ósea actuando bien sobre las funciones de las células osteoblásticas, favoreciendo la capacidad proliferativa o la maduración celular mediante un incremento de ALP y del depósito de iones calcio en la matriz extracelular (225,226); o bien inhibiendo la formación de las células osteoclasticas (227). Entre los mecanismos atribuidos a estos cambios en la actividad osteoblástica se sugiere que ciertos polifenoles pueden modificar la función de los osteoblastos a través de la modulación de distintos factores de transcripción, como Runx2 y diferentes BMP, como osterix y OSC, que a su vez pueden activar a distintos genes implicados en estos procesos (228). En esta línea, Santiago-Mora et al. (2011) (229) determinaron que la oleuropeína era capaz de estimular la osteoblastogénesis e inhibir la diferenciación hacia adipocitos de células madre mesenquimales. Otras teorías sugieren el potencial de ciertos compuestos fenólicos del aceite para inhibir la osteoclastogénesis y la activación de la vía de señalización NF- κ B inducida por el RANKL en precursores de osteoclastos (230). Asimismo numerosos compuestos fenólicos poseen actividad estrogénica o antiestrogénica de manera que pueden tener una actividad preventiva sobre la osteoporosis mediante mecanismos vinculados a dicha actividad (231–233). Sin embargo, la mayor parte de los conocimientos que se tienen en torno a la acción de los polifenoles del aceite sobre el tejido óseo están expresados en términos de proliferación

celular no hallándose en la literatura científica suficiente evidencia que describa la influencia de dichos compuestos sobre parámetros de diferenciación/maduración celular y los mecanismos de acción que subyacen al efecto que estas biomoléculas ejercen sobre el hueso, por lo que su utilidad terapéutica aún no es del todo conocida, de ahí el interés de su estudio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Buckwalter JA, Cooper RR. Bone structure and function. Instr Course Lect. 1987;36:27-48.
2. Aubin JE, Liu F, Malaval L, Gupta AK. Osteoblast and chondroblast differentiation. Bone. agosto de 1995;17(2 Suppl):77S-83S.
3. Titorencu I, Pruna V, Jinga VV, Simionescu M. Osteoblast ontogeny and implications for bone pathology: an overview. Cell Tissue Res. 1 de enero de 2014;355(1):23-33.
4. Buck DW, Dumanian GA. Bone Biology and Physiology: Part I. The Fundamentals. Plast Reconstr Surg. junio de 2012;129(6):1314-20.
5. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. Instr Course Lect. 1996;45:371-86.
6. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. Clin J Am Soc Nephrol CJASN. noviembre de 2008;3 Suppl 3:S131-139.
7. Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. Arch Biochem Biophys. 1 de noviembre de 2014;561:3-12.
8. Florencio-Silva R, Sasso GR da S, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. BioMed Res Int. 2015;2015:421746.
9. Puzas JE. The Osteoblast. En: Favus MJ, editor. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, Second Edition. Nueva York: Raven Press; 1993. p. 15-20.
10. Jayakumar P, Di Silvio L. Osteoblasts in bone tissue engineering. Proc Inst Mech Eng [H]. diciembre de 2010;224(12):1415-40.

11. Bostrom MPG, Yang X, Koutras I. Biologics in bone healing. *Curr Opin Orthop.* 2000;11:403-12.
12. Eriksen EF. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord.* diciembre de 2010;11(4):219-27.
13. Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol.* 10 de marzo de 2006;7:14.
14. Ehrlich PJ, Lanyon LE. Mechanical strain and bone cell function: a review. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA.* septiembre de 2002;13(9):688-700.
15. Taipaleenmäki H, Bjerre Hokland L, Chen L, Kauppinen S, Kassem M. Mechanisms in endocrinology: micro-RNAs: targets for enhancing osteoblast differentiation and bone formation. *Eur J Endocrinol.* marzo de 2012;166(3):359-71.
16. Grigoriadis AE, Heersche JN, Aubin JE. Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *J Cell Biol.* 1 de junio de 1988;106(6):2139-51.
17. Giustina A, Mazziotti G, Canalis E. Growth hormone, insulin-like growth factors, and the skeleton. *Endocr Rev.* agosto de 2008;29(5):535-59.
18. Nakashima K, de Crombrughe B. Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. *Trends Genet TIG.* agosto de 2003;19(8):458-66.
19. Kapinas K, Delany AM. MicroRNA biogenesis and regulation of bone remodeling. *Arthritis Res Ther.* 27 de mayo de 2011;13(3):220.
20. Fonseca-Velásquez A, Garzón-Alvarado DA. Model Bone of Komarova Implementation for the sensitivity study of the process of remodelling bony before changes in local factors. *Ing Cienc Ingcien.* 1 de diciembre de 2009;5(10):107-32.

21. Ogston N, Harrison AJ, Cheung HF, Ashton BA, Hampson G. Dexamethasone and retinoic acid differentially regulate growth and differentiation in an immortalised human clonal bone marrow stromal cell line with osteoblastic characteristics. *Steroids*. octubre de 2002;67(11):895-906.
22. Mundy GR, Boyce B, Hughes D, Wright K, Bonewald L, Dallas S, et al. The effects of cytokines and growth factors on osteoblastic cells. *Bone*. agosto de 1995;17(2 Suppl):71S-75S.
23. Tullberg-Reinert H, Jundt G. 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*. octubre de 1999;112(4):271-6.
24. Histology of Bone: Background, Gross Structure of Long Bone, Nerves and Vasculature of Bone. 24 de mayo de 2018 [citado 12 de septiembre de 2018]; Disponible en: <https://emedicine.medscape.com/article/1254517-overview>
25. Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, et al. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature*. 1 de agosto de 1996;382(6590):448-52.
26. Dost P, Ten Cate WJF, Wiemann M. Osteoblast-like cell cultures from human stapes. *Acta Otolaryngol (Stockh)*. diciembre de 2002;122(8):836-40.
27. Tanaka S, Narusawa K, Onishi H, Miura M, Hijioka A, Kanazawa Y, et al. Lower osteocalcin and osteopontin contents of the femoral head in hip fracture patients than osteoarthritis patients. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA*. febrero de 2011;22(2):587-97.
28. Gericke A, Qin C, Spevak L, Fujimoto Y, Butler WT, Sørensen ES, et al. Importance of phosphorylation for osteopontin regulation of biomineralization. *Calcif* 49

Tissue Int. julio de 2005;77(1):45-54.

29. Giachelli CM, Steitz S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol.* diciembre de 2000;19(7):615-22.

30. Zohar R, Lee W, Arora P, Cheifetz S, McCulloch C, Sodek J. Single cell analysis of intracellular osteopontin in osteogenic cultures of fetal rat calvarial cells. *J Cell Physiol.* enero de 1997;170(1):88-100.

31. McKee MD, Nanci A. Osteopontin and the bone remodeling sequence. Colloidal-gold immunocytochemistry of an interfacial extracellular matrix protein. *Ann N Y Acad Sci.* 21 de abril de 1995;760:177-89.

32. Sodek J, Chen J, Nagata T, Kasugai S, Todescan R, Li IW, et al. Regulation of osteopontin expression in osteoblasts. *Ann N Y Acad Sci.* 21 de abril de 1995;760:223-41.

33. Dodds RA, Connor JR, James IE, Rykaczewski EL, Appelbaum E, Dul E, et al. Human osteoclasts, not osteoblasts, deposit osteopontin onto resorption surfaces: an in vitro and ex vivo study of remodeling bone. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* noviembre de 1995;10(11):1666-80.

34. McKee MD, Nanci A. Osteopontin at mineralized tissue interfaces in bone, teeth, and osseointegrated implants: ultrastructural distribution and implications for mineralized tissue formation, turnover, and repair. *Microsc Res Tech.* 1 de febrero de 1996;33(2):141-64.

35. Ross FP, Chappel J, Alvarez JI, Sander D, Butler WT, Farach-Carson MC, et al. Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin alpha v beta 3 potentiate bone resorption. *J Biol Chem.* 5 de mayo de 1993;268(13):9901-7.

36. Reinholt FP, Hultenby K, Oldberg A, Heinegård D. Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. junio de 1990;87(12):4473-5.
37. Wada T, McKee MD, Steitz S, Giachelli CM. Calcification of vascular smooth muscle cell cultures: inhibition by osteopontin. *Circ Res*. 5 de febrero de 1999;84(2):166-78.
38. Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J*. 1 de julio de 1996;317(Pt 1):59-64.
39. Brodsky B, Shah NK. Protein motifs. 8. The triple-helix motif in proteins. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. diciembre de 1995;9(15):1537-46.
40. van der Rest M, Garrone R. Collagen family of proteins. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. octubre de 1991;5(13):2814-23.
41. Niyibizi C, Eyre DR. Structural characteristics of cross-linking sites in type V collagen of bone. Chain specificities and heterotypic links to type I collagen. *Eur J Biochem*. 15 de septiembre de 1994;224(3):943-50.
42. Alford AI, Kozloff KM, Hankenson KD. Extracellular matrix networks in bone remodeling. *Int J Biochem Cell Biol*. agosto de 2015;65:20-31.
43. Reyes-Botella C, Montes MJ, Vallecillo-Capilla MF, Olivares EG, Ruiz C. Antigenic phenotype of cultured human osteoblast-like cells. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol*. 2002;12(5-6):359-64.
44. Bachelard-Cascales E, Chapellier M, Delay E, Pochon G, Voeltzel T, Puisieux A, et al. The CD10 enzyme is a key player to identify and regulate human mammary stem cells. *Stem Cells Dayt Ohio*. junio de 2010;28(6):1081-8.
45. Lee K-W, Sung CO, Kim JH, Kang M, Yoo H-Y, Kim H-H, et al. CD10

expression is enhanced by Twist1 and associated with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma with facilitating tumorigenicity in vitro and in vivo. *Int J Cancer*. 15 de enero de 2015;136(2):310-21.

46. Cappelleso-Fleury S., Puissant-Lubrano B, Apoil PA, Titeux M. Human fibroblasts share immunosuppressive properties with bone marrow mesenchymal stem cells. - PubMed - NCBI. *J Clin Immunol*. 2010;30(4):607-19.

47. Montes MJ, Alemán P, García-Tortosa C, Borja C, Ruiz C, García-Olivares E. Cultured human decidual stromal cells express antigens associated with hematopoietic cells. *J Reprod Immunol*. febrero de 1996;30(1):53-66.

48. Díaz-Rodríguez L, García-Martínez O, Arroyo-Morales M, Reyes-Botella C, Ruiz C. Antigenic phenotype and phagocytic capacity of MG-63 osteosarcoma line. *Ann N Y Acad Sci*. septiembre de 2009;1173 Suppl 1:E46-54.

49. Reyes-Botella C, Montes MJ, Abadía-Molina AC, Vallecillo-Capilla MF, Ruiz C. CD10 expression in cultured human osteoblast-like cells. *Folia Biol (Praha)*. 1999;45(6):257-60.

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

51. Sherman L, Sleeman J, Dall P, Hekele A, Moll J, Ponta H, et al. The CD44 proteins in embryonic development and in cancer. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1996;213 (Pt 1):249-69.

52. Puré E, Cuff CA. A crucial role for CD44 in inflammation. *Trends Mol Med*. mayo de 2001;7(5):213-21.

53. Schmits R, Filmus J, Gerwin N, Senaldi G, Kiefer F, Kundig T, et al. CD44

regulates hematopoietic progenitor distribution, granuloma formation, and tumorigenicity. *Blood*. 15 de septiembre de 1997;90(6):2217-33.

54. Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: From adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol*. enero de 2003;4(1):33-45.

55. Reyes-Botella C, Montes MJ, Vallecillo-Capilla MF, Olivares EG, Ruiz C. Expression of molecules involved in antigen presentation and T cell activation (HLA-DR, CD80, CD86, CD44 and CD54) by cultured human osteoblasts. *J Periodontol*. abril de 2000;71(4):614-7.

56. Bozec A, Zaiss MM, Kagwiria R, Voll R, Rauh M, Chen Z, et al. T cell costimulation molecules CD80/86 inhibit osteoclast differentiation by inducing the IDO/tryptophan pathway. *Sci Transl Med*. 7 de mayo de 2014;6(235):235ra60.

57. Díaz-Rodríguez L, García-Martínez O, Morales MA-, Rodríguez-Pérez L, Rubio-Ruiz B, Ruiz C. Effects of indomethacin, nimesulide, and diclofenac on human MG-63 osteosarcoma cell line. *Biol Res Nurs*. enero de 2012;14(1):98-107.

58. Pérez E, García-Martínez O, Arroyo-Morales M, Reyes-Botella C, Ruiz C. Modulation of antigenic phenotype in cultured human osteoblast-like cells by FGFb, TGFbeta1, PDGF-BB, IL-2, IL-1beta, LPS and IFNgamma. *Biosci Rep*. agosto de 2006;26(4):281-9.

59. García-Martínez O, Reyes-Botella C, Díaz-Rodríguez L, Luna-Bertos ED, Ramos-Torrecillas J, Vallecillo-Capilla MF, et al. Effect of Platelet-Rich Plasma on Growth and Antigenic Profile of Human Osteoblasts and Its Clinical Impact. *J Oral Maxillofac Surg*. 1 de julio de 2012;70(7):1558-64.

60. García-Martínez O, Díaz-Rodríguez L, Rodríguez-Pérez L, De Luna-Bertos E, Reyes Botella C, Ruiz CC. Effect of acetaminophen, ibuprofen and methylprednisolone

on different parameters of human osteoblast-like cells. *Arch Oral Biol.* abril de 2011;56(4):317-23.

61. Qi H, Aguiar DJ, Williams SM, Pean AL, Pan W, Verfaillie CM. Identification of genes responsible for osteoblast differentiation from human mesodermal progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci.* 18 de marzo de 2003;100(6):3305-10.

62. Ducy P, Karsenty G. Two distinct osteoblast-specific cis-acting elements control expression of a mouse osteocalcin gene. *Mol Cell Biol.* abril de 1995;15(4):1858-69.

63. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell.* 30 de mayo de 1997;89(5):747-54.

64. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, et al. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell.* 30 de mayo de 1997;89(5):755-64.

65. Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, et al. *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell.* 30 de mayo de 1997;89(5):765-71.

66. Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and *Cbfa1*. *Endocr Rev.* agosto de 2000;21(4):393-411.

67. Garcia T, Roman-roman S, Jackson A, Theilhaber J, Connolly T, Spinella-jaegle S, et al. Behavior of osteoblast, adipocyte, and myoblast markers in genome-wide expression analysis of mouse calvaria primary osteoblasts in vitro. *Bone.* julio de 2002;31(1):205-11.

68. Malaval L, Liu F, Roche P, Aubin JE. Kinetics of osteoprogenitor proliferation

and osteoblast differentiation in vitro. J Cell Biochem [Internet]. 1999 [citado 3 de octubre de 2018];74. Disponible en:

[https://www.readcube.com/articles/10.1002/\(SICI\)1097-](https://www.readcube.com/articles/10.1002/(SICI)1097-)

[4644\(19990915\)74:4<616::AID-JCB11>3.0.CO;2-Q](https://www.readcube.com/articles/10.1002/(SICI)1097-4644(19990915)74:4<616::AID-JCB11>3.0.CO;2-Q)

69. Anderson HC. Matrix vesicles and calcification. Curr Rheumatol Rep. junio de 2003;5(3):222-6.

70. Roberts S, Narisawa S, Harmey D, Millán JL, Farquharson C. Functional Involvement of PHOSPHO1 in Matrix Vesicle–Mediated Skeletal Mineralization. J Bone Miner Res. 1 de abril de 2007;22(4):617-27.

71. Yoshiko Y, Candelieri GA, Maeda N, Aubin JE. Osteoblast Autonomous Pi Regulation via Pit1 Plays a Role in Bone Mineralization. Mol Cell Biol. 15 de junio de 2007;27(12):4465-74.

72. Matsuo K, Irie N. Osteoclast–osteoblast communication. Arch Biochem Biophys. 15 de mayo de 2008;473(2):201-9.

73. Chen X, Wang Z, Duan N, Zhu G, Schwarz EM, Xie C. Osteoblast-osteoclast interactions. Connect Tissue Res. marzo de 2018;59(2):99-107.

74. Felix R, Cecchini MG, Hofstetter W, Elford PR, Stutzer A, Fleisch H. Impairment of macrophage colony-stimulating factor production and lack of resident bone marrow macrophages in the osteopetrotic op/op mouse. J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res. julio de 1990;5(7):781-9.

75. Yavropoulou MP, Yovos JG. Osteoclastogenesis--current knowledge and future perspectives. J Musculoskelet Neuronal Interact. septiembre de 2008;8(3):204-16.

76. Sodek J, McKee MD. Molecular and cellular biology of alveolar bone. Periodontol 2000. octubre de 2000;24:99-126.

77. Teitelbaum SL. Osteoclasts: What Do They Do and How Do They Do It? *Am J Pathol.* 1 de febrero de 2007;170(2):427-35.
78. Clinkenbeard EL, Cass TA, Ni P, Hum JM, Bellido T, Allen MR, et al. Conditional Deletion of Murine Fgf23: Interruption of the Normal Skeletal Responses to Phosphate Challenge and Rescue of Genetic Hypophosphatemia. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 2016;31(6):1247-57.
79. Karsenty G, Ferron M. The contribution of bone to whole-organism physiology. *Nature.* enero de 2012;481(7381):314-20.
80. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, et al. Endocrine Regulation of Energy Metabolism by the Skeleton. *Cell.* 10 de agosto de 2007;130(3):456-69.
81. Karsenty G. Bone endocrine regulation of energy metabolism and male reproduction. *C R Biol.* octubre de 2011;334(10):720-4.
82. Ferron M, Hinoi E, Karsenty G, Ducy P. Osteocalcin differentially regulates β cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Natl Acad Sci.* 1 de abril de 2008;105(13):5266-70.
83. Oury F, Sumara G, Sumara O, Ferron M, Chang H, Smith CE, et al. Endocrine Regulation of Male Fertility by the Skeleton. *Cell.* 4 de marzo de 2011;144(5):796-809.
84. Ruiz C, Pérez E, García-Martínez O, Díaz-Rodríguez L, Arroyo-Morales M, Reyes-Botella C. Expression of cytokines IL-4, IL-12, IL-15, IL-18, and IFN γ and modulation by different growth factors in cultured human osteoblast-like cells. *J Bone Miner Metab.* 2007;25(5):286-92.
85. Ruiz C, Pérez E, Vallecillo-Capilla M, Reyes-Botella C. Phagocytosis and Allogeneic T Cell Stimulation by Cultured Human Osteoblast-Like Cells. *Cell Physiol*

Biochem. 11 de noviembre de 2003;13(5):309-14.

86. Stanley KT, VanDort C, Motyl C, Endres J, Fox DA. Immunocompetent properties of human osteoblasts: interactions with T lymphocytes. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* enero de 2006;21(1):29-36.

87. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature.* octubre de 2003;425(6960):841-6.

88. Visnjic D, Kalajzic Z, Rowe DW, Katavic V, Lorenzo J, Aguila HL. Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood.* 1 de mayo de 2004;103(9):3258-64.

89. Kode A, Manavalan JS, Mosialou I, Bhagat G, Rathinam CV, Luo N, et al. Leukaemogenesis induced by an activating β -catenin mutation in osteoblasts. *Nature.* febrero de 2014;506(7487):240-4.

90. Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat.* enero de 2006;235(1):176-90.

91. Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF. The osteocyte: an endocrine cell ... and more. *Endocr Rev.* octubre de 2013;34(5):658-90.

92. Burger EH, Klein-Nulend J, Smit TH. Strain-derived canalicular fluid flow regulates osteoclast activity in a remodelling osteon--a proposal. *J Biomech.* octubre de 2003;36(10):1453-9.

93. Currey JD. The many adaptations of bone. *J Biomech.* octubre de 2003;36(10):1487-95.

94. Xiao Z, Zhang S, Mahlios J, Zhou G, Magenheimer BS, Guo D, et al. Cilia-like structures and polycystin-1 in osteoblasts/osteocytes and associated abnormalities in

skeletogenesis and Runx2 expression. *J Biol Chem.* 13 de octubre de 2006;281(41):30884-95.

95. Santos A, Bakker AD, Zandieh-Doulabi B, de Bleeck-Hogervorst JMA, Klein-Nulend J. Early activation of the beta-catenin pathway in osteocytes is mediated by nitric oxide, phosphatidyl inositol-3 kinase/Akt, and focal adhesion kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1 de enero de 2010;391(1):364-9.

96. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* febrero de 2011;26(2):229-38.

97. Burger EH, Klein-Nulend J. Mechanotransduction in bone--role of the lacuno-canalicular network. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 1999;13 Suppl:S101-112.

98. Sato M, Asada N, Kawano Y, Wakahashi K, Minagawa K, Kawano H, et al. Osteocytes Regulate Primary Lymphoid Organs and Fat Metabolism. *Cell Metab.* 5 de noviembre de 2013;18(5):749-58.

99. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 15 de mayo de 2003;423(6937):337-42.

100. Boyce BF, Hughes DE, Wright KR, Xing L, Dai A. Recent advances in bone biology provide insight into the pathogenesis of bone diseases. *Lab Investig J Tech Methods Pathol.* febrero de 1999;79(2):83-94.

101. Crockett JC, Mellis DJ, Scott DI, Helfrich MH. New knowledge on critical osteoclast formation and activation pathways from study of rare genetic diseases of osteoclasts: focus on the RANK/RANKL axis. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA.* enero de 2011;22(1):1-20.

102. Blair HC, Athanasou NA. Recent advances in osteoclast biology and pathological bone resorption. *Histol Histopathol.* 2004;19(1):189-99.

103. Phan TCA, Xu J, Zheng MH. Interaction between osteoblast and osteoclast: impact in bone disease. *Histol Histopathol.* 2004;19(4):1325-44.
104. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol.* mayo de 2008;61(5):577-87.
105. Downey PA, Siegel MI. Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *Phys Ther.* enero de 2006;86(1):77-91.
106. Aszódi A, Bateman JF, Gustafsson E, Boot-Handford R, Fässler R. Mammalian skeletogenesis and extracellular matrix: what can we learn from knockout mice? *Cell Struct Funct.* abril de 2000;25(2):73-84.
107. Yagami K, Suh JY, Enomoto-Iwamoto M, Koyama E, Abrams WR, Shapiro IM, et al. Matrix GLA protein is a developmental regulator of chondrocyte mineralization and, when constitutively expressed, blocks endochondral and intramembranous ossification in the limb. *J Cell Biol.* 29 de noviembre de 1999;147(5):1097-108.
108. Niyibizi C, Eyre DR. Bone type V collagen: chain composition and location of a trypsin cleavage site. *Connect Tissue Res.* 1989;20(1-4):247-50.
109. Viguet-Carrin S, Garnero P, Delmas PD. The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA.* 2006;17(3):319-36.
110. Rich A, Crick FH. The molecular structure of collagen. *J Mol Biol.* octubre de 1961;3:483-506.
111. Ramachandran G, editor. *Biochemistry of Collagen* [Internet]. Springer US; 1976 [citado 16 de septiembre de 2018]. Disponible en: [//www.springer.com/us/book/9781475746044](http://www.springer.com/us/book/9781475746044)
112. Price PA, Otsuka AA, Poser JW, Kristaponis J, Raman N. Characterization of a

gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. Proc Natl Acad Sci U S A. mayo de 1976;73(5):1447-51.

113. Boskey AL. Osteopontin and related phosphorylated sialoproteins: effects on mineralization. Ann N Y Acad Sci. 21 de abril de 1995;760:249-56.

114. Fujisawa R, Nodasaka Y, Kuboki Y. Further characterization of interaction between bone sialoprotein (BSP) and collagen. Calcif Tissue Int. febrero de 1995;56(2):140-4.

115. Glimcher MJ. The nature of the mineral component of bone and the mechanism of calcification. Instr Course Lect. 1987;36:49-69.

116. Fisher LW, Termine JD, Dejter SW, Whitson SW, Yanagishita M, Kimura JH, et al. Proteoglycans of developing bone. J Biol Chem. 25 de mayo de 1983;258(10):6588-94.

117. Gundberg CM. Matrix proteins. Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA. septiembre de 2003;14 Suppl 5:S37-40; discussion S40-42.

118. Canalis E, McCarthy T, Centrella M. Growth factors and the regulation of bone remodeling. J Clin Invest. febrero de 1988;81(2):277-81.

119. Shapiro F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. Eur Cell Mater. 1 de abril de 2008;15:53-76.

120. Ortega N, Behonick DJ, Werb Z. Matrix remodeling during endochondral ossification. Trends Cell Biol. febrero de 2004;14(2):86-93.

121. Berendsen AD, Olsen BR. Bone development. Bone. noviembre de 2015;80:14-8.

122. Hauge EM, Qvesel D, Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F. Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* septiembre de 2001;16(9):1575-82.
123. Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone Remodeling. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2006 [citado 17 de septiembre de 2018];1092. Disponible en: <https://www.readcube.com/articles/10.1196/annals.1365.035>
124. Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C, et al. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol.* 3 de mayo de 1999;145(3):527-38.
125. Li X, Qin L, Bergenstock M, Bevelock LM, Novack DV, Partridge NC. Parathyroid hormone stimulates osteoblastic expression of MCP-1 to recruit and increase the fusion of pre/osteoclasts. *J Biol Chem.* 9 de noviembre de 2007;282(45):33098-106.
126. Saftig P, Hunziker E, Wehmeyer O, Jones S, Boyde A, Rommerskirch W, et al. Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 10 de noviembre de 1998;95(23):13453-8.
127. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science.* 1 de septiembre de 2000;289(5484):1504-8.
128. Everts V, Delaissé JM, Korper W, Jansen DC, Tigchelaar-Gutter W, Saftig P, et al. The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* enero de 2002;17(1):77-90.
129. Tang Y, Wu X, Lei W, Pang L, Wan C, Shi Z, et al. TGF-beta1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nat Med.* julio de 2009;15(7):757-65.

130. Zhao C, Irie N, Takada Y, Shimoda K, Miyamoto T, Nishiwaki T, et al. Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Cell Metab.* agosto de 2006;4(2):111-21.
131. Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ. Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP. *Bone.* julio de 1996;19(1 Suppl):1S-12S.
132. Negishi-Koga T, Takayanagi H. Bone cell communication factors and Semaphorins. *BoneKey Rep.* 19 de septiembre de 2012;1:183.
133. Pederson L, Ruan M, Westendorf JJ, Khosla S, Oursler MJ. Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 30 de diciembre de 2008;105(52):20764-9.
134. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology.* diciembre de 2001;142(12):5050-5.
135. Hofbauer LC, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone.* septiembre de 1999;25(3):255-9.
136. Lee SK, Lorenzo JA. Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology.* agosto de 1999;140(8):3552-61.
137. Kitazawa R, Kitazawa S, Maeda S. Promoter structure of mouse RANKL/TRANCE/OPGL/ODF gene. *Biochim Biophys Acta.* 14 de abril de 1999;1445(1):134-41.
138. Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, et al.

Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology*. octubre de 1999;140(10):4382-9.

139. Okazaki R, Inoue D, Shibata M, Saika M, Kido S, Ooka H, et al. Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor (ER) alpha or beta. *Endocrinology*. junio de 2002;143(6):2349-56.

140. Willett WC, Sacks F, Trichopoulos A, Drescher G, Ferro-Luzzi A, Helsing E, et al. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *Am J Clin Nutr*. 1995;61(6 Suppl):1402S-1406S.

141. Martínez-González MA, Guillén-Grima F, De Irala J, Ruíz-Canela M, Bes-Rastrollo M, Beunza JJ, et al. The Mediterranean diet is associated with a reduction in premature mortality among middle-aged adults. *J Nutr*. septiembre de 2012;142(9):1672-8.

142. Salas-Salvadó J, Bulló M, Babio N, Martínez-González MÁ, Ibarrola-Jurado N, Basora J, et al. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with the Mediterranean diet: results of the PREDIMED-Reus nutrition intervention randomized trial. *Diabetes Care*. enero de 2011;34(1):14-9.

143. Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas M-I, Corella D, Arós F, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N Engl J Med*. 4 de abril de 2013;368(14):1279-90.

144. Khazai N, Judd SE, Tangpricha V. Calcium and vitamin D: skeletal and extraskeletal health. *Curr Rheumatol Rep*. abril de 2008;10(2):110-7.

145. Matkovic V. Nutrition, genetics and skeletal development. *J Am Coll Nutr*. 63

diciembre de 1996;15(6):556-69.

146. Waterman E, Lockwood B. Active components and clinical applications of olive oil. *Altern Med Rev J Clin Ther.* diciembre de 2007;12(4):331-42.

147. Gutiérrez-Rosales F, Ríos J.J, Gómez-Rey ML. Main Polyphenols in the Bitter Taste of Virgin Olive Oil. Structural Confirmation by On-Line High-Performance Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry [Internet]. 2003 [citado 20 de septiembre de 2018]. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf021199x>

148. Servili M, Selvaggini R, Esposito S, Taticchi A, Montedoro G, Morozzi G. Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *J Chromatogr A.* octubre de 2004;1054(1-2):113-27.

149. Boskou D, Blekas G, Tsimidou M. Olive oil composition. Academic Press and AOCS Press; 2006. 41-72 p.

150. Fuentes de Mendoza M, De Miguel Gordillo C, Marín Expósito J, Sánchez Casas J, Martínez Cano M, Martín Vertedor D, et al. Chemical composition of virgin olive oils according to the ripening in olives. *Food Chem.* 1 de diciembre de 2013;141(3):2575-81.

151. Cicatelli A, Fortunati T, De Feis I, Castiglione S. Oil composition and genetic biodiversity of ancient and new olive (*Olea europea* L.) varieties and accessions of southern Italy. *Plant Sci.* 1 de septiembre de 2013;210:82-92.

152. Guerfel M, Ben Mansour M, Ouni Y, Guido F, Boujnah D, Zarrouk M. Triacylglycerols Composition and Volatile Compounds of Virgin Olive Oil from Chemlali Cultivar: Comparison among Different Planting Densities. *Sci World J* [Internet]. 26 de abril de 2012 [citado 22 de septiembre de 2018];2012. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3353306/>

153. Frega N, Bocci F, Lercker G (Florence U (Italy) D di S e TA e M. Free fatty acids and diacylglycerols as quality parameters for extra virgin olive oil. Riv Ital Delle Sostanze Grasse Italy [Internet]. 1993 [citado 22 de septiembre de 2018]; Disponible en: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=IT9460723>
154. Paganuzzi V. Monoglycerides in Vegetable Oils. Note IV: Raw Oils of Low Unsaturation. Riv Ital Sost Grasse. 1999;76:457-71.
155. Smith TJ. Squalene: potential chemopreventive agent. Expert Opin Investig Drugs. agosto de 2000;9(8):1841-8.
156. Rao CV, Newmark HL, Reddy BS. Chemopreventive effect of squalene on colon cancer. Carcinogenesis. 1 de febrero de 1998;19(2):287-90.
157. Lanzón A, Albi T, Cert A, Gracián J. The hydrocarbon fraction of virgin olive oil and changes resulting from refining. J Am Oil Chem Soc. 1 de marzo de 1994;71(3):285-91.
158. Franco MN, Galeano-Díaz T, Sánchez J, De Miguel C, Martín-Vertedor D. Total phenolic compounds and tocopherols profiles of seven olive oil varieties grown in the south-west of Spain. J Oleo Sci. 2014;63(2):115-25.
159. Choe E, Min DB. Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation. Compr Rev Food Sci Food Saf. 1 de septiembre de 2006;5(4):169-86.
160. Mínguez- Mosquera MI. Clorofilas y carotenoides en tecnología de alimentos. Sevilla, España: Universidad de Sevilla; 1997. 192 p.
161. Psomiadou E, Tsimidou M. Pigments in Greek virgin olive oils: occurrence and levels. J Sci Food Agric. 15 de mayo de 2001;81(7):640-7.
162. Criado MN, Romero MP, Motilva MJ. Effect of the technological and agronomical factors on pigment transfer during olive oil extraction. J Agric Food Chem. 65

11 de julio de 2007;55(14):5681-8.

163. Moyano MJ, Heredia FJ, Meléndez-Martínez MJ. The Color of Olive Oils: The Pigments and Their Likely Health Benefits and Visual and Instrumental Methods of Analysis. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2010;9:278-91.

164. Fernández-Arche A, Marquez-Martín A, Vazquez R de la P, Perona JS, Terencio C, Perez-Camino C, et al. Long-chain fatty alcohols from pomace olive oil modulate the release of proinflammatory mediators. *J Nutr Biochem.* 1 de marzo de 2009;20(3):155-62.

165. Singh DK, Li L, Porter TD. Policosanol Inhibits Cholesterol Synthesis in Hepatoma Cells by Activation of AMP-Kinase. *J Pharmacol Exp Ther.* 1 de septiembre de 2006;318(3):1020-6.

166. Reiter B, Lorbeer E. Analysis of the wax ester fraction of olive oil and sunflower oil by gas chromatography–mass spectroscopy. *J Am Oil Chem Soc.* 9 de enero de 2001;78:881-8.

167. Alvarruiz A, Álvarez-Ortí M, Mateos B, Sena E, Pardo JE. Quality and Composition of Virgin Olive Oil from Varieties Grown in Castilla-La Mancha (Spain). *J Oleo Sci.* 2015;64(10):1075-82.

168. Sánchez-Quesada C, López-Biedma A, Warleta F, Campos M, Beltrán G, Gaforio JJ. Bioactive Properties of the Main Triterpenes Found in Olives, Virgin Olive Oil, and Leaves of *Olea europaea*. *J Agric Food Chem.* 18 de diciembre de 2013;61(50):12173-82.

169. Hatanaka A. The biogenesis of green odour by green leaves. *Phytochemistry.* 1 de noviembre de 1993;34(5):1201-18.

170. Angerosa F, Lanza B, Marsilio V. Biogenesis of «fusty» defect in virgin olive oils.

Grasas Aceites. 30 de junio de 1996;47(3):142-50.

171. Aparicio R, Rocha SM, Delgadillo I, Morales MT. Detection of Rancid Defect in Virgin Olive Oil by the Electronic Nose. *J Agric Food Chem*. 1 de marzo de 2000;48(3):853-60.

172. Servili M, Esposito S, Fabiani R, Urbani S, Taticchi A, Mariucci F, et al. Phenolic compounds in olive oil: antioxidant, health and organoleptic activities according to their chemical structure. *Inflammopharmacology*. abril de 2009;17(2):76-84.

173. Baldioli M, Servili M, Perretti G, Montedoro GF. Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *J Am Oil Chem Soc*. 1 de noviembre de 1996;73(11):1589-93.

174. Obied HK, Karuso P, Prenzler PD, Robards K. Novel secoiridoids with antioxidant activity from Australian olive mill waste. *J Agric Food Chem*. 18 de abril de 2007;55(8):2848-53.

175. Han J, Talorete TPN, Yamada P, Isoda H. Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. *Cytotechnology*. enero de 2009;59(1):45-53.

176. Martínez Nieto L, Hodaifa G, Lozano Peña JL. Changes in phenolic compounds and Rancimat stability of olive oils from varieties of olives at different stages of ripeness. *J Sci Food Agric*. noviembre de 2010;90(14):2393-8.

177. Uceda M, Hermoso M, García-Ortiz A, Jiménez A, Beltrán G. Intraspecific variation of oil contents and the characteristics of oils in olive cultivars. *Acta Hortic*. 1 de abril de 1999;474:659-62.

178. Inglese P, Famiani F, Galvano F, Servili M, Esposito S, Urbani S. Factors Affecting Extra-Virgin Olive Oil Composition. En: *Horticultural Reviews* [Internet].

Wiley-Blackwell; 2011 [citado 20 de septiembre de 2018]. p. 83-147. Disponible en:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780470872376.ch3>

179. Oliveras-López MJ, Innocenti M, Giaccherini C, Ieri F, Romani A, Mulinacci N. Study of the phenolic composition of spanish and italian monocultivar extra virgin olive oils: Distribution of lignans, secoiridoidic, simple phenols and flavonoids. *Talanta*. 15 de octubre de 2007;73(4):726-32.

180. Alagna F, Geu-Flores F, Kries H, Panara F, Baldoni L, O'Connor SE, et al. Identification and Characterization of the Iridoid Synthase Involved in Oleuropein Biosynthesis in Olive (*Olea europaea*) Fruits. *J Biol Chem*. 11 de marzo de 2016;291(11):5542-54.

181. Beauchamp GK, Keast RSJ, Morel D, Lin J, Pika J, Han Q, et al. Phytochemistry: Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature*. septiembre de 2005;437(7055):45-6.

182. Garrido Fernandez, A, Adams, M.R, Fernandez-Diez, M.J. *Table Olives - Production and processing* [Internet]. London (UK): Chapman & Hall; 1997 [citado 20 de septiembre de 2018]. 67-109 p. Disponible en:
[//www.springer.com/gp/book/9780412718106](http://www.springer.com/gp/book/9780412718106)

183. Rivas A, Sanchez-Ortiz A, Jimenez B, García-Moyano J, Lorenzo ML. Phenolic acid content and sensory properties of two Spanish monovarietal virgin olive oils. *Eur J Lipid Sci Technol*. 1 de junio de 2013;115(6):621-30.

184. Determination of phenolic acids in virgin olive oil. *Food Chem*. 1 de enero de 1991;39(2):237-40.

185. Bonoli M, Bendini A, Cerretani L, Lercker G, Toschi TG. Qualitative and semiquantitative analysis of phenolic compounds in extra virgin olive oils as a function

of the ripening degree of olive fruits by different analytical techniques. *J Agric Food Chem.* 17 de noviembre de 2004;52(23):7026-32.

186. Montedoro G, Servili M, Baldioli M, Miniati E. Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. 1992;40(9):1571-6.

187. Schwingshackl L, Hoffmann G. Monounsaturated fatty acids, olive oil and health status: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Lipids Health Dis.* 1 de octubre de 2014;13:154.

188. Rahmani AH, Albutti AS, Aly SM. Therapeutics role of olive fruits/oil in the prevention of diseases via modulation of anti-oxidant, anti-tumour and genetic activity. *Int J Clin Exp Med.* 2014;7(4):799-808.

189. Buckland G, Travier N, Barricarte A, Ardanaz E, Moreno-Iribas C, Sánchez M-J, et al. Olive oil intake and CHD in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Spanish cohort. *Br J Nutr.* 14 de diciembre de 2012;108(11):2075-82.

190. Guasch-Ferré M, Hu FB, Martínez-González MA, Fitó M, Bulló M, Estruch R, et al. Olive oil intake and risk of cardiovascular disease and mortality in the PREDIMED Study. *BMC Med.* 13 de mayo de 2014;12:78.

191. Carluccio MA, Massaro M, Scoditti E, De Caterina R. Vasculoprotective potential of olive oil components. *Mol Nutr Food Res.* octubre de 2007;51(10):1225-34.

192. Covas M-I, Torre R de la, Fitó M. Virgin olive oil: a key food for cardiovascular risk protection. *Br J Nutr.* abril de 2015;113(S2):S19-28.

193. Pérez-Martínez P, García-Ríos A, Delgado-Lista J, Pérez-Jiménez F, López-Miranda J. Mediterranean diet rich in olive oil and obesity, metabolic syndrome and diabetes mellitus. *Curr Pharm Des.* 2011;17(8):769-77.

194. Soriguer F, Rojo-Martínez G, Goday A, Bosch-Comas A, Bordiú E, Caballero-Díaz F, et al. Olive oil has a beneficial effect on impaired glucose regulation and other cardiometabolic risk factors. Di@bet.es study. *Eur J Clin Nutr.* septiembre de 2013;67(9):911-6.
195. Ebaid GMX, Seiva FRF, Rocha KKHR, Souza GA, Novelli ELB. Effects of olive oil and its minor phenolic constituents on obesity-induced cardiac metabolic changes. *Nutr J.* 19 de octubre de 2010;9:46.
196. Cao K, Xu J, Zou X, Li Y, Chen C, Zheng A, et al. Hydroxytyrosol prevents diet-induced metabolic syndrome and attenuates mitochondrial abnormalities in obese mice. *Free Radic Biol Med.* febrero de 2014;67:396-407.
197. Liu Y, Xu X, Bi D, Wang X, Zhang X, Dai H, et al. Influence of squalene feeding on plasma leptin, testosterone & blood pressure in rats. *Indian J Med Res.* febrero de 2009;129(2):150-3.
198. de Melo CL, Queiroz MGR, Fonseca SGC, Bizerra AMC, Lemos TLG, Melo TS, et al. Oleanolic acid, a natural triterpenoid improves blood glucose tolerance in normal mice and ameliorates visceral obesity in mice fed a high-fat diet. *Chem Biol Interact.* 15 de abril de 2010;185(1):59-65.
199. Buckland G, Bach A, Serra-Majem L. Obesity and the Mediterranean diet: a systematic review of observational and intervention studies. *Obes Rev Off J Int Assoc Study Obes.* noviembre de 2008;9(6):582-93.
200. Psaltopoulou T, Kostis RI, Haidopoulos D, Dimopoulos M, Panagiotakos DB. Olive oil intake is inversely related to cancer prevalence: a systematic review and a meta-analysis of 13,800 patients and 23,340 controls in 19 observational studies. *Lipids Health Dis.* 30 de julio de 2011;10:127.

201. Sirianni R, Chimento A, De Luca A, Casaburi I, Rizza P, Onofrio A, et al. Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit MCF-7 breast cancer cell proliferation interfering with ERK1/2 activation. *Mol Nutr Food Res.* junio de 2010;54(6):833-40.
202. Maggiolini M, Bonofiglio D, Marsico S, Panno ML, Cenni B, Picard D, et al. Estrogen receptor alpha mediates the proliferative but not the cytotoxic dose-dependent effects of two major phytoestrogens on human breast cancer cells. *Mol Pharmacol.* septiembre de 2001;60(3):595-602.
203. Gill CIR, Boyd A, McDermott E, McCann M, Servili M, Selvaggini R, et al. Potential anti-cancer effects of virgin olive oil phenols on colorectal carcinogenesis models in vitro. *Int J Cancer.* 20 de octubre de 2005;117(1):1-7.
204. Hashim YZH-Y, Rowland IR, McGlynn H, Servili M, Selvaggini R, Taticchi A, et al. Inhibitory effects of olive oil phenolics on invasion in human colon adenocarcinoma cells in vitro. *Int J Cancer.* 1 de febrero de 2008;122(3):495-500.
205. Pampaloni B, Mavilia C, Fabbri S, Romani A, Ieri F, Tanini A, et al. In vitro effects of extracts of extra virgin olive oil on human colon cancer cells. *Nutr Cancer.* 2014;66(7):1228-36.
206. Braga C, La Vecchia C, Franceschi S, Negri E, Parpinel M, Decarli A, et al. Olive oil, other seasoning fats, and the risk of colorectal carcinoma. *Cancer.* 1 de febrero de 1998;82(3):448-53.
207. Benito E, Stiggelbout A, Bosch FX, Obrador A, Kaldor J, Mulet M, et al. Nutritional factors in colorectal cancer risk: a case-control study in Majorca. *Int J Cancer.* 9 de septiembre de 1991;49(2):161-7.
208. Pelucchi C, Bosetti C, Negri E, Lipworth L, La Vecchia C. Olive oil and cancer risk: an update of epidemiological findings through 2010. *Curr Pharm Des.*

2011;17(8):805-12.

209. Fabiani R, De Bartolomeo A, Rosignoli P, Servili M, Montedoro GF, Morozzi G. Cancer chemoprevention by hydroxytyrosol isolated from virgin olive oil through G1 cell cycle arrest and apoptosis. *Eur J Cancer Prev Off J Eur Cancer Prev Organ ECP*. agosto de 2002;11(4):351-8.

210. Corona G, Deiana M, Incani A, Vauzour D, Dessì MA, Spencer JPE. Inhibition of p38/CREB phosphorylation and COX-2 expression by olive oil polyphenols underlies their anti-proliferative effects. *Biochem Biophys Res Commun*. 26 de octubre de 2007;362(3):606-11.

211. Fabiani R, Sepporta MV, Rosignoli P, De Bartolomeo A, Crescimanno M, Morozzi G. Anti-proliferative and pro-apoptotic activities of hydroxytyrosol on different tumour cells: the role of extracellular production of hydrogen peroxide. *Eur J Nutr*. junio de 2012;51(4):455-64.

212. Garcia-Martinez O, Ruiz C, Gutierrez-Ibanez A, Illescas-Montes R, Melguizo-Rodriguez L. Benefits of Olive Oil Phenolic Compounds in Disease Prevention. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2018;18(4):333-40.

213. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 8 de diciembre de 2011;365(23):2205-19.

214. Rosillo MA, Sánchez-Hidalgo M, Sánchez-Fidalgo S, Aparicio-Soto M, Villegas I, Alarcón-de-la-Lastra C. Dietary extra-virgin olive oil prevents inflammatory response and cartilage matrix degradation in murine collagen-induced arthritis. *Eur J Nutr*. febrero de 2016;55(1):315-25.

215. Rosillo MÁ, Alcaraz MJ, Sánchez-Hidalgo M, Fernández-Bolaños JG, Alarcón-de-la-Lastra C, Ferrándiz ML. Anti-inflammatory and joint protective effects of extra-

virgin olive-oil polyphenol extract in experimental arthritis. *J Nutr Biochem*. diciembre de 2014;25(12):1275-81.

216. Rosillo MA, Sánchez-Hidalgo M, González-Benjumea A, Fernández-Bolaños JG, Lubberts E, Alarcón-de-la-Lastra C. Preventive effects of dietary hydroxytyrosol acetate, an extra virgin olive oil polyphenol in murine collagen-induced arthritis. *Mol Nutr Food Res*. diciembre de 2015;59(12):2537-46.

217. Kremer JM, Lawrence DA, Jubiz W, DiGiacomo R, Rynes R, Bartholomew LE, et al. Dietary fish oil and olive oil supplementation in patients with rheumatoid arthritis. Clinical and immunologic effects. *Arthritis Rheum*. junio de 1990;33(6):810-20.

218. Puel C, Coxam V, Davicco M-J. Régime méditerranéen et ostéoporose. *médecine/sciences*. 1 de agosto de 2007;23(8-9):756-60.

219. Fernández-Real JM, Bulló M, Moreno-Navarrete JM, Ricart W, Ros E, Estruch R, et al. A Mediterranean Diet Enriched with Olive Oil Is Associated with Higher Serum Total Osteocalcin Levels in Elderly Men at High Cardiovascular Risk. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 1 de agosto de 2012 [citado 19 de septiembre de 2017]; Disponible en: http://press.endocrine.org/doi/10.1210/jc.2012-2221?url_ver=Z39.88-

2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&

220. Martínez-Ramírez MJ, Palma S, Martínez-González MA, Delgado-Martínez AD, de la Fuente C, Delgado-Rodríguez M. Dietary fat intake and the risk of osteoporotic fractures in the elderly. *Eur J Clin Nutr*. septiembre de 2007;61(9):1114-20.

221. Rivas A, Romero A, Mariscal M, Monteagudo C, Hernández J, Olea-Serrano F. Validation of questionnaires for the study of food habits and bone mass. *Nutr Hosp*. 2009;24(5):521-8.

222. Trichopoulou A, Georgiou E, Bassiakos Y, Lipworth L, Lagiou P, Proukakis C,

et al. Energy intake and monounsaturated fat in relation to bone mineral density among women and men in Greece. *Prev Med.* junio de 1997;26(3):395-400.

223. Liu H, Huang H, Li B, Wu D, Wang F, Zheng X hua, et al. Olive oil in the prevention and treatment of osteoporosis after artificial menopause. *Clin Interv Aging.* 2014;9:2087-95.

224. Saleh NK, Saleh HA. Olive oil effectively mitigates ovariectomy-induced osteoporosis in rats. *BMC Complement Altern Med.* 2011;11:10.

225. Trzeciakiewicz A, Habauzit V, Horcajada M-N. When nutrition interacts with osteoblast function: molecular mechanisms of polyphenols. *Nutr Res Rev.* junio de 2009;22(1):68-81.

226. García-Martínez O, De Luna-Bertos E, Ramos-Torrecillas J, Ruiz C, Milia E, Lorenzo ML, et al. Phenolic Compounds in Extra Virgin Olive Oil Stimulate Human Osteoblastic Cell Proliferation. *PloS One.* 2016;11(3):e0150045.

227. Hagiwara K, Goto T, Araki M, Miyazaki H, Hagiwara H. Olive polyphenol hydroxytyrosol prevents bone loss. *Eur J Pharmacol.* 15 de julio de 2011;662(1):78-84.

228. Zhao J, Ohba S, Shinkai M, Chung U-I, Nagamune T. Icaritin induces osteogenic differentiation in vitro in a BMP- and Runx2-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun.* 2 de mayo de 2008;369(2):444-8.

229. Santiago-Mora R, Casado-Díaz A, De Castro MD, Quesada-Gómez JM. Oleuropein enhances osteoblastogenesis and inhibits adipogenesis: the effect on differentiation in stem cells derived from bone marrow. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA.* febrero de 2011;22(2):675-84.

230. Yamaguchi M, Weitzmann MN. Quercetin, a potent suppressor of NF- κ B and

Smad activation in osteoblasts. *Int J Mol Med.* octubre de 2011;28(4):521-5.

231. Riesco E, Aubertin-Leheudre M, Maltais ML, Audet M, Dionne IJ. Synergic effect of phytoestrogens and exercise training on cardiovascular risk profile in exercise-responder postmenopausal women: a pilot study. *Menopause N Y N.* octubre de 2010;17(5):1035-9.

232. Bolca S, Urpi-Sarda M, Blondeel P, Roche N, Vanhaecke L, Possemiers S, et al. Disposition of soy isoflavones in normal human breast tissue. *Am J Clin Nutr.* abril de 2010;91(4):976-84.

233. Keiler AM, Zierau O, Bernhardt R, Scharnweber D, Lemonakis N, Termetzi A, et al. Impact of a functionalized olive oil extract on the uterus and the bone in a model of postmenopausal osteoporosis. *Eur J Nutr.* junio de 2014;53(4):1073-81.

JUSTIFICACIÓN

Dado que la evidencia científica, mediante estudios previos *in vivo e in vitro*, ha demostrado el efecto bioestimulante que los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen extra ejercen sobre la proliferación celular y debido a la escasez de estudios que analicen la capacidad de los compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva para modular la función y diferenciación/maduración celular en osteoblastos, se pretende estudiar *in vitro* la actividad de los extractos fenólicos obtenidos a partir de diferentes variedades de aceite de oliva virgen extra y de distintos compuestos fenólicos como ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido cumárico, luteolina y apigenina, sobre distintos parámetros celulares de los osteoblastos humanos.

HIPÓTESIS

Los compuestos fenólicos y extractos fenólicos de diferentes variedades de aceite de oliva virgen extra, tienen un efecto beneficioso sobre el osteoblasto al favorecer la diferenciación/maduración de esta población celular en términos de aumentar la síntesis de fosfatasa alcalina, y modular la expresión tanto de antígenos de la superficie celular como de genes relacionados con los procesos de diferenciación/maduración del osteoblasto.

OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de los compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva virgen extra sobre distintos parámetros celulares del osteoblasto, utilizando para tal fin la línea celular tipificada MG-63.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar *in vitro* el efecto de los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen extra sobre la expresión de antígenos de superficie relacionados con la diferenciación celular (CD54, CD80, CD86 y HLA-DR) y sobre la actividad de la fosfatasa alcalina en osteoblastos humanos en cultivo.
2. Analizar el efecto de los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen extra sobre la expresión génica de diferentes marcadores implicados en la maduración / diferenciación y función de los osteoblastos.
3. Determinar el efecto de los extractos fenólicos de diferentes variedades de aceite de oliva virgen extra (Picual, Arbequina, Picudo y Hojiblanca) sobre la diferenciación, expresión antigénica y capacidad fagocítica de los osteoblastos de la línea celular MG-63.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN/ RESULTS & DISCUSSION

OBJETIVO 1

Estudiar *in vitro* el efecto de los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen extra sobre la expresión de antígenos de superficie relacionados con la diferenciación celular (CD54, CD80, CD86 y HLA-DR) y sobre la actividad de la fosfatasa alcalina en osteoblastos humanos en cultivo.

ABSTRACT

Osteoporosis is a skeletal disorder characterized by compromised bone strength that predisposes individuals to an increased risk of fracture. Previous *in vivo* and *in vitro* studies have reported that phenolic compounds present in extra virgin olive oil have a beneficial effect on osteoblasts in terms of increase cell proliferation. The aim of this study was to determine whether phenolic compounds present in olive oil could modify the expression of cell differentiation markers on osteoblasts. An *in vitro* experimental design was performed using MG-63 osteoblasts cell line. MG63 cells were exposed to different doses of luteolin, apigenin, or p-coumaric, caffeic, or ferulic acid. Alkaline phosphatase (ALP) was evaluated by spectrophotometry and antigen expression (CD54, CD80, CD86, and HLA-DR) by flow cytometry. At 24 h, treated groups showed an increased ALP and modulated antigen profile, with respect to the non-treated group. These results demonstrate that the phenolic compounds studied induce cell maturation *in vitro*, increasing ALP synthesis and reducing the expression of antigens involved in immune functions of the osteoblast which would improve bone density.

Keywords: phenolic compounds, *olea europaea*, osteoblastic cells, phenotype profile, alkaline phosphatase activity.

INTRODUCTION

Bone metabolic diseases develop when there is an imbalance between the formation and resorption of bone, that depend on the interaction between osteoblasts and osteoclasts. Osteoporosis is the most common bone metabolic disease in adults, especially among the elderly, which is characterized by compromised bone strength that predisposes individuals to an increased risk of fracture. Most current pharmacological approaches focus on inhibiting bone resorption in patients with osteoporosis or at risk of developing the disease ^{1,2}. However, researchers have also provided evidence on dietary components that can optimize bone mass and stimulate bone formation ³. Thus, Habauzit & Horcajada (2008) reported that phytonutrients in our diet, especially polyphenols, can act on both osteoblasts and osteoclasts to modulate bone metabolism.

Bone formation involves a complex series of events, including osteoprogenitor cell proliferation and differentiation, which eventually result in the formation of a mineralized extracellular matrix. Numerous cytokines, hormones, and growth factors control bone formation by regulating osteoblast cell proliferation and differentiation ⁵. Bone is a dynamic tissue under continuous remodeling process where osteoblasts, which derive from undifferentiated pluripotent mesenchymal cells ⁶, are responsible for bone development. It has been described that osteoblasts have immunological functions because the expression of markers of antigen-presenting capacity (CD54, CD80, CD86, HLA-DR) which is modulated in the presence of cytokines, growth factors, platelet-rich plasma, bacterial lipopolysaccharide, or even certain pharmaceuticals ⁷⁻¹².

Olive oil is the main fat used in the Mediterranean Diet and contains numerous minor compounds, including phenolic compounds, that can be divided among phenolic acids, phenolic alcohols, secoiridoids, lignans, and flavones¹³⁻¹⁵.

It has been demonstrated that phenolic compounds can modulate osteoblast cell functions¹⁶⁻²⁰. However, to our knowledge, no data are available on the ability of olive oil phenolic compounds to regulate cultured osteoblast differentiation. The objective of the present study was to determine the effect of phenolic compounds on osteoblastic (MG-63) cell differentiation by evaluating the antigenic profile and alkaline phosphatase (ALP) activities.

MATERIAL AND METHODS

Study Design

An *in vitro* experimental design was performed using MG-63 osteoblasts cell line.

Chemicals compounds

Standards of apigenin, luteolin and caffeic, p-coumaric, and ferulic acids were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Stock solutions of phenolic compounds were prepared in methanol and stored at -20°C. All solvents used were of analytical or HPLC grade (Sigma-Aldrich). Water was of Milli-Q quality (Millipore Corp, Bedford, MA).

Cell Culture

The human MG-63 osteosarcoma cell line was purchased from American Type Cultures Collection (ATCC, Manassas, VA) and maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Invitrogen Gibco Cell Culture Products, Carlsbad, CA) with 100 IU/mL penicillin (Lab Roger SA, Barcelona, Spain), 50 µg/mL gentamicin (Braun Medical SA, Jaen, Spain), 2.5 µg/mL amphotericin B (Sigma, St Louis, MO, USA), and 1% glutamine (Sigma, St Louis, MO, USA), 2% HEPES (Sigma, St Louis, MO, USA), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Paisley, UK). Cultures were kept at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂. Cells were detached from culture flask with a solution of 0.05% trypsin (Sigma, St Louis, MO, USA) and 0.02% ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) (Sigma, St Louis, MO, USA) and were then washed and suspended in complete culture medium with 10% FBS.

Antigenic phenotype by flow cytometry

Osteoblasts were previously treated with 10⁻⁶M and 10⁻⁸M of apigenin, luteolin, or p-coumaric, ferulic, or caffeic acid for 24 h at 37°C. Cells were then detached from the cultured flask by treatment with 0.4% EDTA solution, washed and suspended in phosphate-buffered saline (PBS) at 2x10⁴cells/mL. Cells were labeled by direct staining with anti-CD54, CD80, CD86, and HLA-DR monoclonal antibodies (mAbs) (IOL1b, CD80, CD86, and OKDR, respectively; all from Invitrogen Corp, Carlsbad, CA). The fluorochrome used to label the antibody was Fluorescein-Isothiocyanate. Aliquots of 100 µl of the cell suspension were incubated with 10 µl of the appropriate mAb for 30 min at 4 °C in the dark. Cells were washed, suspended in 1 mL of PBS and immediately analyzed

in a flow cytometer with diode laser (FASC Canton II, SE Becton Dickinson, Palo Alto, CAL) at a wavelength of 488 nm to determine the percentage of fluorescent cells. Untreated cells were stained with mAbs as negative control. The percentage of antibody-positive cells was calculated from counts of 2000- 3000 cells. At least three experiments were run for each antigen in all cultures.

Alkaline phosphatase activity

MG-63 cells were treated at confluence with culture medium containing 10mM β -glycerophosphate and 50 μ g/mL ascorbic acid to promote differentiation. After 6 days, cells were incubated with 10⁻⁶M and 10⁻⁸M of apigenin, luteolin, or p-coumaric, ferulic, or caffeic acid for 48 h at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂. Cells were lysed with 0.1% Triton X-100 at 37°C. The samples were centrifuged at 1500 rpm and the supernatants stored at -70°C until used. ALP activity was quantified with a colorimetric assay (Diagnostic kit 104-LL, Sigma, St. Louis, MO) using p-nitrophenylphosphate as substrate. An aliquot (50 μ L) of cell lysate solution was added to 50 μ L of ALP substrate (Sigma) and was incubated at 37°C for 45min in darkness. The enzymatic reaction was stopped by adding 50 μ L of 0.1M NaOH, and the absorbance was measured at 405 nm with a spectrophotometer (Biotek ELx800). The total protein content was estimated by the Bradford method using a protein assay kit from Bio-Rad Laboratories (Nazareth-Eke, Belgium). All samples were run in triplicate, and the ALP activity was expressed as a percentage, considering enzymatic activity in the absence of phenolic compounds as 100%. All assays were compared to a control group of cells grown under the same conditions but not treated.

Statistical analysis

Data were expressed as means \pm standard deviation (SD) and compared using the Student's *t*-test to determine the expression of different markers related to the antigenic profile of the osteoblast. Analysis of variance (ANOVA) was performed to examine the effects on ALP synthesis of treatment with the different olive oil phenolic compounds in comparison to controls. $P < 0.05$ was considered significant in all tests. At least three experiments were performed for each culture. SPSS version 20.0 (IBM, Chicago, IL) was used for all data analyses.

RESULTS

Antigenic phenotype by flow cytometry

Flow cytometry results showed a significant decrease in CD54 expression *versus* untreated control cells ($p \leq 0.001$) after treatment with each dose of each phenolic compound tested (Table 1). A significant decrease in CD80 expression was observed after treatment with apigenin or ferulic or p-coumaric acid at doses of 10^{-6} M ($p=0.006$, $p=0.025$, and $p=0.012$, respectively) and 10^{-8} M ($p=0.007$, $p=0.04$, and $p=0.007$ respectively). Ferulic acid increased the expression of CD86 or HLA-DR at all doses ($p < 0.001$) and caffeic acid increased CD86 expression at doses of 10^{-6} and 10^{-8} M ($p < 0.001$).

Table 1. Expression of different antigens in MG63 cell line after 24 hours of

	CD54		CD80		CD86		HLA-DR	
	Mean sd ^a	P value	Mean sd ^a	p value	Mean sd ^a	P value	Mean sd ^a	P value
Control	75.13 (4.5)	-	21.86 (2.81)	-	13.33 (0.25)	-	4.60 (0.81)	-
Luteolin 10⁻⁶ M	2.06 (0.70)	0.0001***	17.80 (3.20)	0.17	12.40 (0.45)	0.037*	5.23 (0.90)	0.42
Luteolin 10⁻⁸ M	2.36 (0.45)	0.001***	22.46 (0.76)	0.74	13.96 (0.68)	0.20	4.96 (0.60)	0.56
Apigenin 10⁻⁶M	1.60 (0.26)	0.001***	10.13 (1.96)	0.006**	14.33 (1.27)	0.25	7.60 (0.96)	0.016*
Apigenin 10⁻⁸M	0.86 (0.57)	0.001***	10.30 (1.66)	0.007**	11.50 (1.21)	0.063	5.96 (1.74)	0.31
Cafeic acid 10⁻⁶ M	3.16 (0.41)	0.001***	16.43 (1.61)	0.058	17.63 (0.90)	0.010*	5.46 (0.56)	0.21
Cafeic acid 10⁻⁸ M	3.20 (1.12)	0.001***	18.90 (1.15)	0.20	19.00 (1.64)	0.004**	5.23 (0.51)	0.33
Ferulic acid 10⁻⁶M	0.93 (0.25)	0.001***	15.90 (0.88)	0.025*	29.13 (1.95)	0.005**	37.50 (3.67)	0.0001***
Ferulic acid 10⁻⁸ M	1.06 (0.15)	0.001***	15.60 (1.93)	0.04*	33.16 (0.72)	0.0001***	36.30 (1.21)	0.0001***
Cumaric acid 10⁻⁶ M	1.76 (0.25)	0.001***	12.26 (1.62)	0.012*	13.96 (1.04)	0.40	7.00 (1.57)	0.10
Cumaric acid 10⁻⁸M	0.90 (0.10)	0.001***	7.33 (1.02)	0.007**	12.53 (0.49)	0.08	5.23 (0.11)	0.31

incubation with different doses of phenolic compounds by flow cytometry.

^a standar deviation. * P < 0.05. ** P < 0.01. *** P < 0.001

Effect of phenolic compound on alkaline phosphatase activity

The presence in the osteogenic medium of apigenin, ferulic acid, p-coumaric acid, luteolin, and caffeic acid had a positive effect ($p=0.084$) on the ALP activity of the MG63 cells at all doses except for the lowest doses of luteolin and caffeic acid (Table 2).

Table 2. Alkaline phosphatase (ALP) activity in MG63 cell line after 48 h of treatment with different doses of phenolic compounds. Data are expressed as U/mg protein.

	% of expression	sd ^a	P value
Control	100		-
Luteolin 10⁻⁶ M	209.09	8.69	0.008**
Luteolin 10⁻⁸ M	81.81	11.11	0.08
Apigenin 10⁻⁶ M	209.08	8.51	0.014*
Apigenin 10⁻⁸ M	145.45	18.75	0.05*
Cafeic acid 10⁻⁶ M	145.00	6.24	0.006**
Cafeic acid 10⁻⁸ M	127.27	7.14	0.016*
Ferulic acid 10⁻⁶ M	209.90	9.37	0.007**
Ferulic acid 10⁻⁸ M	209.09	8.69	0.015*
Cumaric acid 10⁻⁶ M	145.45	18.75	0.045*
Cumaric acid 10⁻⁸ M	100	9.09	0.68

^astandar deviation, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001

DISCUSSION

The present results demonstrate that phenolic compounds found in extra virgin olive oil exert an action on various cell parameters. With regard to cell differentiation, doses of 10^{-6} M and 10^{-8} M of each compound produced a major and significant increase in ALP activity, suggesting a favorable effect on the maturation process. The strongest effect on ALP was obtained with luteolin at higher doses.

It has been demonstrated that different phenolic compounds in vegetable species (e.g., resveratrol in wine or quercetin in grape or onion) can modulate osteoblastic functions, such as their proliferative capacity or cell maturation, by increasing ALP activity and calcium ion deposition in the extracellular matrix ^{16,18-20}. In that sense, previous studies have demonstrated that exposure of osteoblasts to phenolic compounds in olive oil, such as, hydroxytyrosol, luteolin, apigenin, p-coumaric, caffeic, and ferulic acids resulted in an increase in the number of cells in 24 h. Other researches have studied different phenolic extracts which stimulated MG-63 cell growth, and they induced higher cell proliferation rates than individual compounds ^{17,21,22}.

Osteoblast lineage differentiation is a complex process characterized by the sequential and defined expression of tissue-specific genes that permit the identification of three phases: proliferation, maturation, and extracellular matrix synthesis/mineralization. Specific genes for the differentiated osteoblast phenotype are expressed in the second phase, including genes that encode for ALP and osteocalcin, producing a high level of ALP synthesis ²³.

With regard to the effect of polyphenols on bone cell function, it is known, for example, that resveratrol can modify osteoblast function by modulating transcription factors such as Cbfa1/Runx2 and bone morphogenetic proteins such as osterix and osteocalcin, all essential molecules in the induction of osteoblastic differentiation that can in turn activate different genes involved in these processes ^{16,24,25}. It has been described that the consumption of olives, olive oil, and oleuropein can prevent the loss of bone mass in animal and cell models ²⁶. In this sense, Santiago-Mora *et al* (2011) found that oleuropein, a secoiridoid polyphenol, increases the expression of Runx2 and osterix, indicating that oleuropein enhances osteoblast formation in both initial and later phases of differentiation. The role of oleuropein in osteoblast differentiation was supported by the higher expression levels of other osteoblast markers, such as ALP gene expression/activity or collagen type I gene expression after exposure to this secoiridoid. In line with these findings, we have observed that other polyphenols, i.e., apigenin, luteolin, and ferulic, p-coumaric and caffeic acid, which are found in olive oil, also produce a significant increase in ALP synthesis, favoring osteoblastic differentiation.

Treatment with luteolin or apigenin or caffeic, ferulic, or p-coumaric acid produces a major decrease in the expression of CD54 and CD80 antigens and modulates the expression of CD86 and HLA-DR. Previous studies have described that human osteoblasts obtained by primary culture from bone samples showed a significantly reduced expression of CD54 and CD86 after *in vitro* Transforming Growth Factor beta 1 (TGF- β 1) treatment but a significantly increased expression of these co-stimulatory molecules in response to Interleukin-1 beta (IL-1 β), Interferon gamma (IFN γ), or Lipopolysaccharide (LPS) ⁷. In another study, osteoblastic expression of Interleukin

4,12,15,18 (IL-4, IL-12, IL-15, IL-18), and IFN γ cytokines was similarly modified by different growth factors (Fibroblast Growth Factor (FGF), TGF- β 1, and Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)) and cytokines (IL-1 and IFN γ)¹¹. This accumulated evidence led the authors to propose that the functional capacity of osteoblasts is modulated during their differentiation and maturation, with a gain in their bone-forming function at the expense of their immunological function¹¹. Schett (2011) further corroborates this hypothesis by showing that proinflammatory cytokines (such as IL-1, TNF α and IL-17) are involved in bone loss. The present results also support this hypothesis, with observations of an increase in ALP activity and a parallel decrease in the expression of CD54 and CD80. The presence of any tested dose of ferulic or caffeic acid produced a major increase in the expression of CD86 and HLA-DR, which may be associated with a state of cell activation, given that their expression has been related to the degree of differentiation and/or cellular activation in dendritic cells (DCs)²⁹. Osteoblasts and DCs share features in common, including cytokine synthesis, phagocytic capacity, antigen presentation to T lymphocytes, and the expression of certain antigens, such as CD54, CD80, CD86, and HLA-DR^{11,12,29}. For this reason, the two cell populations have been described as antigenically, morphologically, and functionally related¹². Both the increase in ALP synthesis and the modulated expression of the co-stimulatory molecules may be related to a greater synthesis of TGF- β 1^{30,31}.

Based on the present findings, we conclude that the phenolic compounds studied induce cell maturation *in vitro*, favoring formation of the extracellular matrix, as indicated by the increase in ALP synthesis and loss of the expression of antigens involved in

osteoblastic immune functions. Further research is warranted to confirm the mechanism by which these phenolic compounds favor cell maturation.

REFERENCES

1. Simon LS. Osteoporosis. *Clinics in Geriatric Medicine*. agosto de 2005;21(3):603-29.
2. Suzuki A, Sekiguchi S, Asano S, Itoh M. Pharmacological topics of bone metabolism: recent advances in pharmacological management of osteoporosis. *J Pharmacol Sci*. abril de 2008;106(4):530-5.
3. Mundy GR. Nutritional modulators of bone remodeling during aging. *Am J Clin Nutr*. febrero de 2006;83(2):427S-430S.
4. Habauzit V, Horcajada M-N. Phenolic phytochemicals and bone. *Phytochemistry Reviews*. julio de 2008;7(2):313-44.
5. Notoya M, Nishimura H, Woo J-T, Nagai K, Ishihara Y, Hagiwara H. Curcumin inhibits the proliferation and mineralization of cultured osteoblasts. *Eur J Pharmacol*. 18 de marzo de 2006;534(1-3):55-62.
6. Riggs BL, Khosla S, Melton LJ. A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *J Bone Miner Res*. mayo de 1998;13(5):763-73.

7. Perez E, Garcia-Martinez O, Arroyo-Morales M, Reyes-Botella C, Ruiz C. Modulation of antigenic phenotype in cultured human osteoblast-like cells by FGFb, TGF β 1, PDGF-BB, IL-2, IL-1 β , LPS and IFN γ . Bioscience reports. 2006;26(4):281-9.
8. De Luna-Bertos E, Ramos-Torrecillas J, Garcia-Martinez O, Nez O, Guildford A, et al. Therapeutic Doses of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Inhibit Osteosarcoma MG-63 Osteoblast-Like Cells Maturation, Viability, and Biomineralization Potential. The Scientific World Journal. 19 de septiembre de 2013;2013:e809891.
9. Díaz-Rodríguez L, García-Martínez O, Morales MA-, Rodríguez-Pérez L, Rubio-Ruiz B, Ruiz C. Effects of indomethacin, nimesulide, and diclofenac on human MG-63 osteosarcoma cell line. Biol Res Nurs. enero de 2012;14(1):98-107.
10. García-Martínez O, Reyes-Botella C, Díaz-Rodríguez L, De Luna-Bertos E, Ramos-Torrecillas J, Vallecillo-Capilla MF, et al. Effect of platelet-rich plasma on growth and antigenic profile of human osteoblasts and its clinical impact. J Oral Maxillofac Surg. julio de 2012;70(7):1558-64.
11. Ruiz C, Pérez E, García-Martínez O, Díaz-Rodríguez L, Arroyo-Morales M, Reyes-Botella C. Expression of cytokines IL-4, IL-12, IL-15, IL-18, and IFN γ and modulation by different growth factors in cultured human osteoblast-like cells. J Bone Miner Metab. 1 de septiembre de 2007;25(5):286-92.

12. Ruiz C, Pérez E, Vallecillo-Capilla M, Reyes-Botella C. Phagocytosis and allogeneic T cell stimulation by cultured human osteoblast-like cells. *Cell Physiol Biochem.* 2003;13(5):309-14.
13. Rotondi A, Bendini A, Cerretani L, Mari M, Lercker G, Toschi TG. Effect of olive ripening degree on the oxidative stability and organoleptic properties of cv. Nostrana di Brisighella extra virgin olive oil. *J Agric Food Chem.* 2 de junio de 2004;52(11):3649-54.
14. Lozano-Sánchez J, Segura-Carretero A, Menendez JA, Oliveras-Ferraro C, Cerretani L, Fernández-Gutiérrez A. Prediction of extra virgin olive oil varieties through their phenolic profile. Potential cytotoxic activity against human breast cancer cells. *J Agric Food Chem.* 22 de septiembre de 2010;58(18):9942-55.
15. Bendini A, Cerretani L, Carrasco-Pancorbo A, Gómez-Caravaca AM, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A, et al. Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules.* 2007;12(8):1679-719.
16. Dai Z, Li Y, Quarles LD, Song T, Pan W, Zhou H, et al. Resveratrol enhances proliferation and osteoblastic differentiation in human mesenchymal stem cells via ER-dependent ERK1/2 activation. *Phytomedicine.* diciembre de 2007;14(12):806-14.

17. García-Martínez O, De Luna-Bertos E, Ramos-Torrecillas J, Ruiz C, Milia E, Lorenzo ML, et al. Phenolic Compounds in Extra Virgin Olive Oil Stimulate Human Osteoblastic Cell Proliferation. PLoS ONE. 2016;11(3):e0150045.
18. Habauzit V, Horcajada M-N. Phenolic phytochemicals and bone. *Phytochem Rev.* 1 de julio de 2008;7(2):313-44.
19. Son Y-O, Kook S-H, Choi K-C, Jang Y-S, Choi Y-S, Jeon Y-M, et al. Quercetin accelerates TNF-alpha-induced apoptosis of MC3T3-E1 osteoblastic cells through caspase-dependent and JNK-mediated pathways. *Eur J Pharmacol.* 28 de enero de 2008;579(1-3):26-33.
20. Trzeciakiewicz A, Habauzit V, Horcajada M-N. When nutrition interacts with osteoblast function: molecular mechanisms of polyphenols. *Nutr Res Rev.* junio de 2009;22(1):68-81.
21. Chin K-Y, Ima-Nirwana S. Olives and Bone: A Green Osteoporosis Prevention Option. *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 26 de julio de 2016;13(8):755.
22. Đudarić L, Fužinac-Smojver A, Muhvić D, Giacometti J. The role of polyphenols on bone metabolism in osteoporosis. *Food Research International.* noviembre de 2015;77:290-8.
23. Papachroni KK, Karatzas DN, Papavassiliou KA, Basdra EK, Papavassiliou AG. Mechanotransduction in osteoblast regulation and bone disease. *Trends Mol Med.* mayo de 2009;15(5):208-16.

24. Yamaguchi M, Jie Z. Effect of polyphenols on calcium content and alkaline phosphatase activity in rat femoral tissues in vitro. *Biol Pharm Bull.* diciembre de 2001;24(12):1437-9.
25. Zhao J, Ohba S, Shinkai M, Chung U-I, Nagamune T. Icariin induces osteogenic differentiation in vitro in a BMP- and Runx2-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun.* 2 de mayo de 2008;369(2):444-8.
26. Puel C, Quintin A, Agalias A, Mathey J, Obled C, Mazur A, et al. Olive oil and its main phenolic micronutrient (oleuropein) prevent inflammation-induced bone loss in the ovariectomised rat. *Br J Nutr.* julio de 2004;92(1):119-27.
27. Santiago-Mora R, Casado-Díaz A, De Castro MD, Quesada-Gómez JM. Oleuropein enhances osteoblastogenesis and inhibits adipogenesis: the effect on differentiation in stem cells derived from bone marrow. *Osteoporos Int.* febrero de 2011;22(2):675-84.
28. Schett G. Effects of inflammatory and anti-inflammatory cytokines on the bone. *Eur J Clin Invest.* diciembre de 2011;41(12):1361-6.
29. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:767-811.
30. Gebken J, Feydt A, Brinckmann J, Notbohm H, Müller PK, Bätge B. Ligand-induced downregulation of receptors for TGF-beta in human osteoblast-like cells from adult donors. *J Endocrinol.* junio de 1999;161(3):503-10.

31. Balooch G, Balooch M, Nalla RK, Schilling S, Filvaroff EH, Marshall GW, et al. TGF-beta regulates the mechanical properties and composition of bone matrix. Proc Natl Acad Sci USA. 27 de diciembre de 2005;102(52):18813-8.

OBJETIVO 2

Analizar el efecto de los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen extra sobre la expresión génica de diferentes marcadores implicados en la maduración/ diferenciación y función de los osteoblastos.

ABSTRACT

Extra-virgin olive oil phenolic compounds can act protecting individuals against cardiovascular and neurodegenerative diseases, cancer, and osteoporosis, among others. Olive oil phenolic compounds can stimulate the proliferation of osteoblasts, modify their antigen profile and promote alkaline phosphatase synthesis. The aim of this study was to determine the effect of different extra-virgin olive oil phenolic compounds on the gene expression of osteoblast-related markers. Cells of the MG63 osteoblastic line were cultured for 24h with 10^{-6} M of the phenolic compounds ferulic acid, caffeic acid, coumaric acid, apigenin or luteolin. Expression of studied markers was quantified using real-time PCR. Expression of osteoblastic growth and differentiation/maturation markers was modified after the phenolic compounds' treatment, most of which increased the gene expression of TGF- β , TGF β -R1, TGF β -R2, TGF β -R3, BMP2, BMP7, Runx-2, ALP, OSC, OSX, Col-I, and OPN. In conclusion, phenolic compounds in extra-virgin olive oil may have a beneficial effect on bone by modulating osteoblast physiology.

Keywords: olive oil phenolic compounds, gene expression, osteoblast, genetic profile

INTRODUCTION

The Mediterranean Diet is a balanced and varied nutritional model characterized by the consumption of fruit, vegetables, polyunsaturated fats (e.g., from fish), and monounsaturated fats (e.g., from dried fruit, nuts, and olive oil) (Sofi, Abbate, Gensini, & Casini, 2010). Extra-virgin olive oil (EVOO), a key component of this diet, contains more than 30 phenolic compounds with antioxidant capacity (Brown, Poudyal, & Panchal, 2015; Pérez-Jiménez, Ruano, Perez-Martinez, Lopez-Segura, & Lopez-Miranda, 2007). The chemical composition of EVOO comprises a majority fraction, mainly triglycerides, and a minority fraction that includes phenolic compounds (Kanakakis et al., 2013). EVOO appears to meet the definition of a functional food proposed by the International Life Sciences Institute (ILSI Europe) in 1993, given its nutritional properties and its beneficial effect on one at least one function of the organism (Ashwell M, 2002). It has been reported that the phenolic compounds in EVOO can protect individuals against cardiovascular and neurodegenerative diseases, cancer, and osteoporosis, among others (Berrougui, Ikhlef, & Khalil, 2015; Boss, Bishop, Marlow, Barnett, & Ferguson, 2016; Casamenti & Stefani, 2017; García-Martínez et al., 2016).

Osteoporosis is characterized by bone mass loss and bone microarchitecture impairment (Bernabei, Martone, Ortolani, Landi, & Marzetti, 2014) and affects around 200 million women worldwide (Kanis JA on behalf of the World Health Organization Scientific Group, s. f.), causing more than 8.9 million fractures a year (Johnell & Kanis, 2006). It results from an imbalance between bone formation and resorption mechanisms (Seeman, 2003; Takayanagi, 2007), with the osteoblast playing a key role as the main cell promoting bone tissue formation and repair. Osteoblasts derive from mesenchymal cells,

99

and their physiology and activity are widely influenced by endocrine, autocrine, and paracrine factors (Florencio-Silva, Sasso, Sasso-Cerri, Simões, & Cerri, 2015).

Phenolic compounds in olive oil have been found to increase the proliferative capacity and differentiation of osteoblasts, among other effects (García-Martínez et al., 2016; Melguizo-Rodríguez, Manzano-Moreno, et al., 2018; Melguizo-Rodríguez, Ramos-Torrecillas, et al., 2018), but the underlying mechanisms of their action remain unknown. Studies of markers related to bone resorption (e.g., osteoprotegerin [OPG] and OPG/receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand [RANKL]) have demonstrated that phenolic compounds in EVOO can inhibit osteoclastogenesis and therefore bone tissue loss (Mousavi et al., 2016; X. Wu et al., 2012). It has also been observed that the EVOO phenolic compound oleuropein can favor bone preservation and repair by increasing the expression of genes related to osteoblastogenesis, including run-related transcription factor 2 (Runx-2), osterix (OSX), collagen type I (Col-I), osteocalcin (OSC), and alkaline phosphatase (ALP) (Santiago-Mora, Casado-Díaz, De Castro, & Quesada-Gómez, 2011), thereby favoring bone preservation and repair.

The aim of this study was to explore the action mechanisms that underlie the preventive effects of EVOO phenolic compounds against osteoporosis, a highly prevalent disease that can be associated with severe complications. The specific objective was to use the MG63 osteoblastic cell line to determine the effects of different EVOO phenolic compounds on the gene expression of osteoblast-related markers, including bone morphogenetic proteins 2 and 7 (BMP-2 and BMP-7), transforming growth factor (TGF)- β 1, TGF- β receptors (TGF- β R1, TGF- β R2; TGF- β R3), Runx-2, ALP, Col-I, OSX, OPG, and OSC.

MATERIAL AND METHODS

Chemical compounds

Caffeic acid, ferulic acid, coumaric acid, luteolin, apigenin, hydroxytyrosol, and tyrosol were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) and kept at -20° C. Aliquots of these phenolic compounds were prepared from mother solutions to achieve the appropriate concentration for each treatment. All solvents used were of analytical or HPLC grade (Sigma-Aldrich), and water was of Milli-Q quality (Millipore Corp, Bedford, MA).

Cell culture

MG63 osteoblast cell line, derived from a 14-yr-old Caucasian male, was obtained from the ATCC. The cells were preserved in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Invitrogen Gibco Cell Culture Products, Carlsbad, CA) with 100 IU/mL penicillin (Lab Roger SA, Barcelona, Spain), 50 µg/mL gentamicin (Braun Medical SA, Jaen, Spain), 2.5 µg/mL amphotericin B (Sigma, St Louis, MO, USA), 1 % glutamine (Sigma), and 2 % HEPES (Sigma) supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Paisley, UK). Cultures were kept at 37 °C in a humidified atmosphere of 95 % air and 5 % CO₂. Cells were separated from the culture flask using 5 mL of a solution of 0.05 % Trypsin (Sigma) and 0.02 % ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Sigma) followed by their neutralization and re-suspension in complete culture medium with 10 % FBS.

RNA extraction and cDNA synthesis (reverse transcription)

mRNA was extracted from the cells by a silicate gel technique using the Qiagen RNeasy extraction kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany), which includes a DNase digestion step. The amount of extracted mRNA was measured by UV spectrophotometry at 260 nm (Eppendorf AG, Hamburg, Germany), and contamination with proteins was determined according to the 260/280 ratio. An equal amount of RNA (1 µg total RNA in 40 µL total volume) was reverse-transcribed to cDNA and amplified by PCR with the iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA), following the manufacturer's instructions.

Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)

mRNA of Runx-2, OSX, OSC, Col-I, BMP-2, BMP-7, TGF-β1, TGFβ-R1, TGFβ-R2 and TGFβ-R3 was detected with primers designed using the NCBI-nucleotide library and Primer3-design (Table 1). All primers had been matched to the mRNA sequences of the target genes (NCBI Blast software). Final results were normalized using ubiquitin C (UBC), peptidylprolyl isomerase A (PPIA), and ribosomal protein S13 (RPS13) as stable housekeeping genes (Ragni, Viganò, Rebullà, Giordano, & Lazzari, 2013).

Quantitative RT-PCR (q-RT-PCR) was performed using the SsoFast™ EvaGreen® Supermix Kit (Bio-Rad laboratories) in accordance with the manufacturer's protocol, as described elsewhere (Manzano-Moreno, Medina-Huertas, Ramos-Torrecillas, García-Martínez, & Ruiz, 2015).

Statistical analysis

SPSS 22.0 (IBM, Chicago, IL) was used for statistical analyses. mRNA levels were expressed as means \pm standard deviation (SD). Multiple analysis of variance was applied for data comparisons, considering $p < 0.05$ to be significant. All studies were conducted in triplicate.

RESULTS

Effect of phenolic compounds on gene expression of TGF- β 1 and its receptors (TGF β -R1, TGF β -R2, and TGF β -R3)

Treatment of the MG63 osteoblast line with 10^{-6} M caffeic acid, ferulic acid, coumaric acid, apigenin, or luteolin for 24 h significantly increased the expression of TGF β 1 and its receptor TGF β -R1, as observed in Figure 1. Expression of receptor TGF β -R2 was significantly increased by treatment with all phenolic compounds except for luteolin, which had no significant effect with respect to untreated control cells. Expression of receptor TGF β -R3 was significantly increased by treatment with all phenolic compounds except for luteolin and coumaric acid.

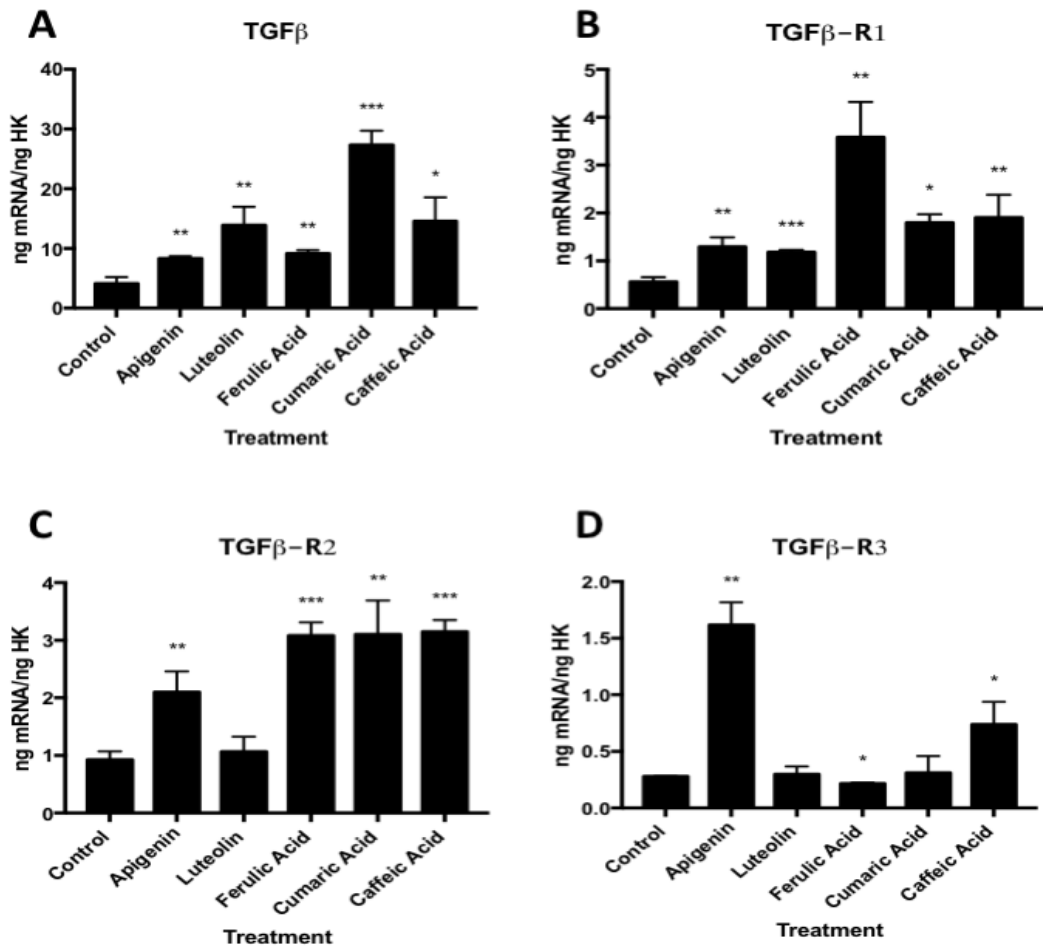


Figure 1: Effect of phenolic compounds on gene expression of TGF-β1 and its receptors (TGFβ- R1, TGFβ-R2, and TGFβ-R3). *P<0.05, **P<0.005, ***P<0.001

Effect of phenolic compounds on gene expression of BMP2 and BMP7

Figure 2 depicts the effect of treatment with 10^{-6} M of each phenolic compound on the gene expression of BMP2 and BMP7 by MG63 cells. As observed, gene expressions of both BMP2 and BMP7 were significantly increased *versus* controls by treatment with each compound except for the expression of BMP2 by luteolin treatment.

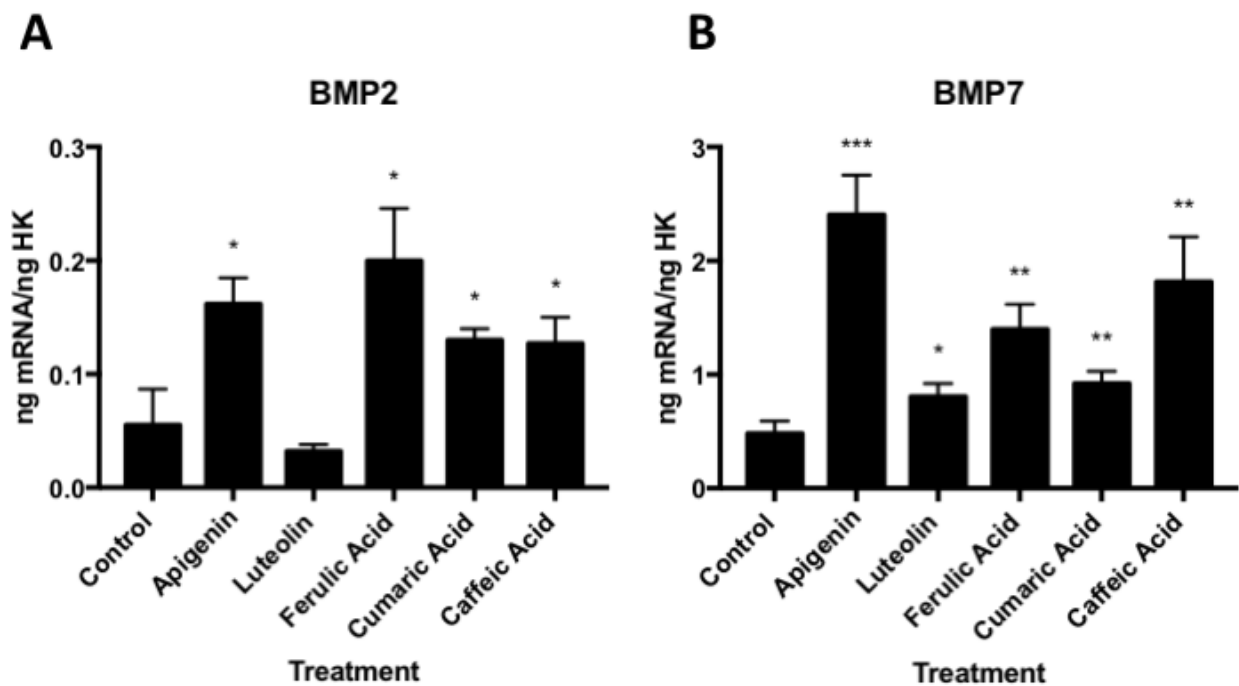


Figure 2. Effect of phenolic compounds on gene expression of BMP2 and BMP7.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$

Effect of phenolic compounds on gene expression of RANKL-OPG complex

As shown in Figure 3, RANKL expression by MG63 cells was increased after treatment with 10^{-6} M of each phenolic compound, and their OPG expression was significantly increased by treatment with apigenin, ferulic acid, or coumaric acid but not by treatment with luteolin or caffeic acid.

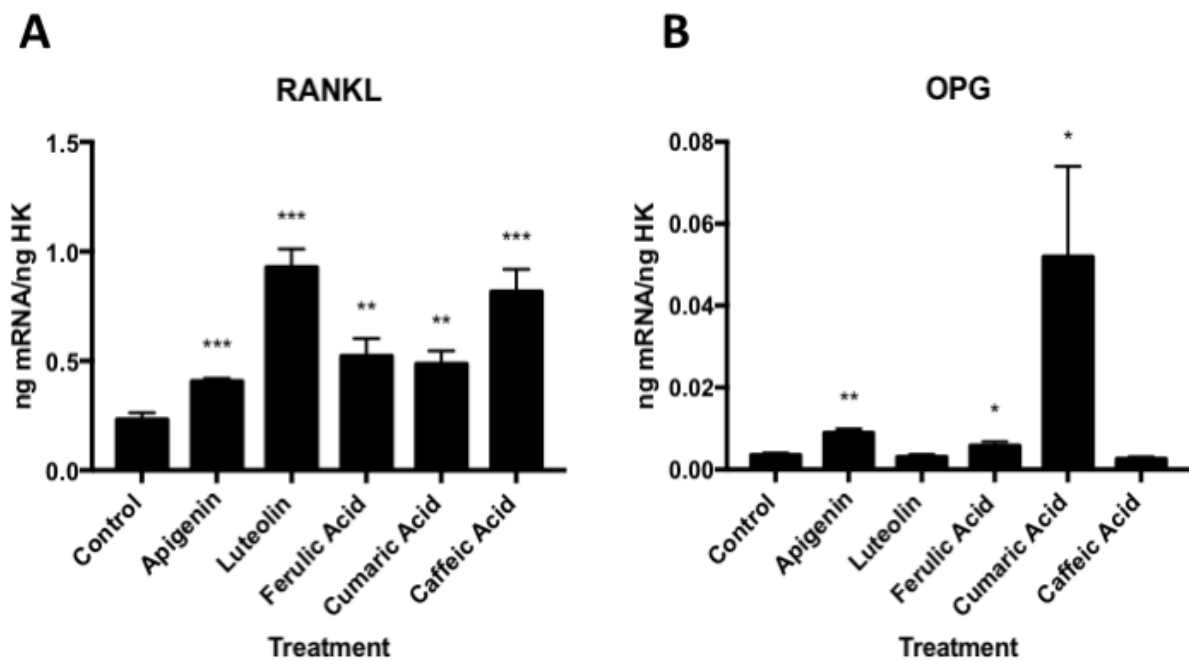


Figure 3. Effect of phenolic compounds on gene expression of RANKL-OPG complex.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$

Effect of phenolic compounds on the gene expression of Runx2, ALP, Col-I, OSX, and OSC

Figure 4 display the q-RT-PCR results for the expression of osteoblast differentiation markers Runx2, ALP, Col-I, OSX, and OSC. Treatment with each phenolic compound increased the expression of all markers except for Col-I, which was not affected by caffeic acid treatment, and Runx2, which was not affected by apigenin treatment.

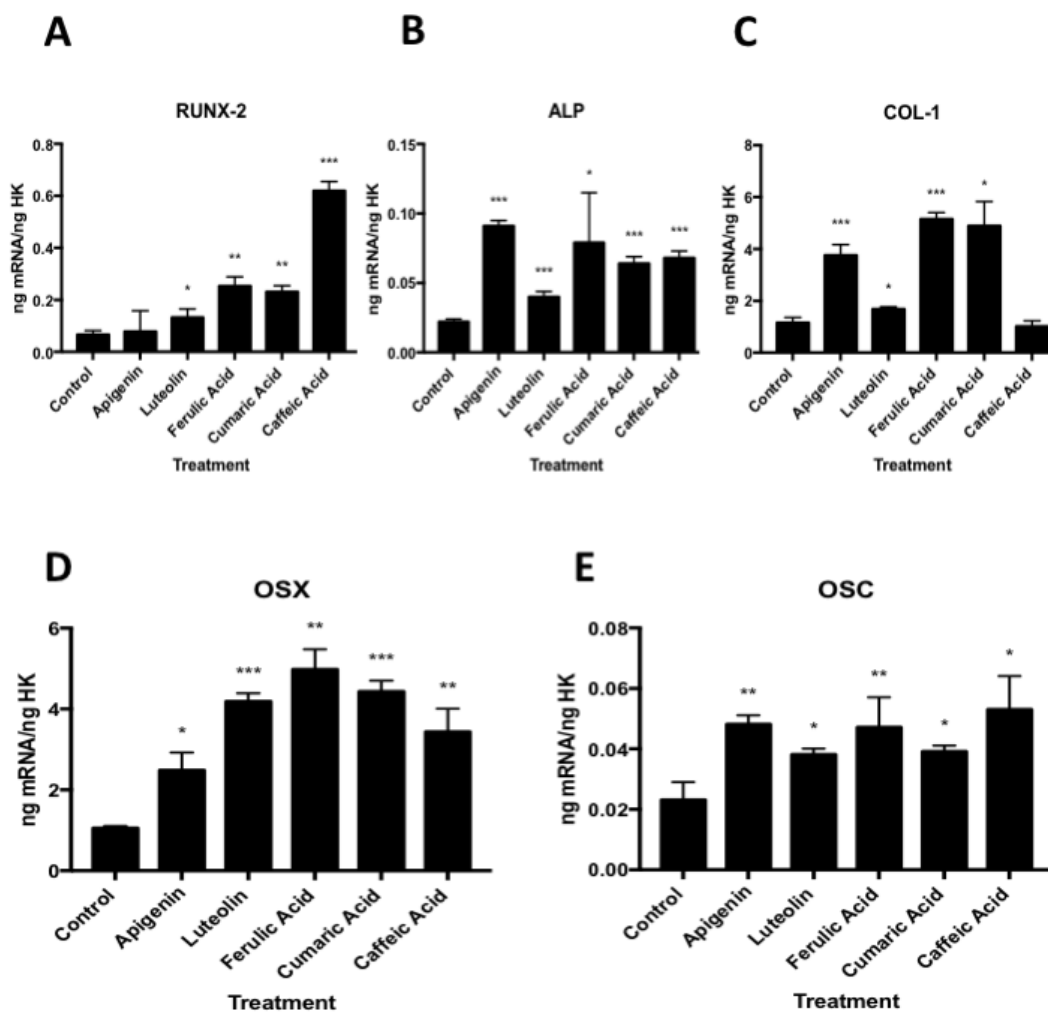


Figure 4. Effect of phenolic compounds on the gene expression of Runx2, ALP, Col-I, OSX, and OSC. *P<0.05, **P<0.005, ***P<0.001

DISCUSSION

This study found that treatment for 24 h with 10^{-6} M of caffeic acid, ferulic acid, coumaric acid, apigenin, or luteolin, phenolic compounds present in VEOO, changes the expression of growth and differentiation markers by MG63 osteoblasts. These findings indicate that bone physiology may be modulated by the phenolic compounds in VEOO, supporting previous observations on their action on osteoblasts at different levels, favoring bone tissue regeneration (36-38).

The expression of TGF- β 1 and its receptors was increased by treatment with each phenolic compound except for coumaric acid, which did not change the expression of TGF- β -R2 or TGF- β -R3, and luteolin, which had no effect on TGF- β -R3 expression. The TGF- β superfamily, which includes TGF- β isoforms 1,2, and 3, BMPs, activins, and nodal proteins, is a set of transmembrane glycoproteins involved in the signaling cascade that regulates osteoblast differentiation and mineralization (Manzano-Moreno et al., 2015; Ochiai et al., 2012; Sun et al., 2016). Moderate doses of TGF- β (1ng/ml and 10ng/ml) have been found to improve the proliferation and differentiation of osteoblasts (Lieb, Vogel, Milz, Dauner, & Schulz, 2004; Miron, Saulacic, Buser, Iizuka, & Sculean, 2013). An increased expression of this marker has also been reported in osteoblasts treated with other bone tissue regenerative therapies (Chen, Dong, Huang, Xu, & She, 2016; Manzano-Moreno et al., 2015; H. Wu, Zha, & Yao, 2010).

BMPs, of which more than 20 have been identified, stimulate bone tissue regeneration and bone cell differentiation, as demonstrated by their effects on ALP and the expression of Col-I, OSC, and OPN, among other cell differentiation markers

(Canalis, Economides, & Gazzerro, 2003; Urist, 1965). In the present study, the expression of both BMP2 and BMP7 was higher after treatment for 24 h with 10^{-6} M of each phenolic compound except for luteolin, which only increased the expression of BMP7. These findings are consistent with results obtained for phenolic compounds in other vegetables. For instance, flavonoids from natural extracts (e.g., icariin or naringin) were found to stimulate bone tissue regeneration by acting on the BMP signaling pathway, favoring the production of molecules closely related to bone metabolism, including ALP, OSC, and OPN (Gaoli et al., 2017; Liang et al., 2012; J.-B. Wu et al., 2008; B. Xu et al., 2018). Likewise, daidzein, a soy phytoestrogen, was reported to stimulate osteoblast proliferation and differentiation by activating the BMP/Smad signaling pathway (B. Hu, Yu, Tang, Li, & Wu, 2016).

The osteogenic differentiation of mesenchymal cells is regulated by various transcriptional factors such as OSX and Runx2/Cbfa1, which are essential for the regulation of genes involved in producing bone extracellular matrix proteins (e.g., ALP, Col-I, bone sialoprotein [BSP], OSC, and OPN) and for the induction of bone mineralization (Hinoi et al., 2006). OSX regulates the expression of osteoblast differentiation markers (e.g., Runx2 and osteonectin [OSN]) and is indispensable for bone proliferation, differentiation, and formation (Franceschi et al., 2003; Nakashima et al., 2002). Expressions of OSX and Runx-2 were significantly increased by treatment with each EVOO phenolic compound in our study except for apigenin, which significantly increased the expression of OSX, although to a lesser extent *versus* the other studied compounds, but had no significant impact on Runx-2 expression. These effects were accompanied by an increase in ALP and OSC expression after all treatments and by an

increase in Col-1 and OPN expression after almost all of them. Treatment of MC3T3-E1 murine osteoblast cells with ugonin K, a flavonoid present in the herbaceous fern-like plant *Helminthostachys zeylanica*, was reported to regulate expression of Runx-2 and OSX and enhance ALP activity, BSP and OSC expression, and mineralization (Lee, Huang, Liao, & Chiou, 2011). Likewise, salvianolic acid B, a phenolic acid from the Chinese medicinal plant *Salvia Miltiorrhiza*, was found to increase the expression by mesenchymal cells of ALP, OPN, Runx-2, and OSC (D. Xu et al., 2014). Increases in the expression of BMP2, Col-I, ALP, and Runx-2 genes by cells and in their ALP activity and mineralization were also observed after treatment with extracts of *Davallia formosana*, a petrophylic fern widely used in traditional Chinese medicine (C.-F. Wu et al., 2017). ALP and Col-I are early matrix mineralization markers, whereas OSC and OPN are osteogenic maturation markers (Rahman, Akhtar, Jamil, Banik, & Asaduzzaman, 2015; Stein GS et al., 1996) that indicate the differentiation and maturation of bone. Taken together, these data suggest that polyphenols in EVOO (e.g., caffeic acid, ferulic acid, coumaric acid, apigenin, and luteolin) may have a beneficial effect on bone physiology, favoring osteoblast maturation and differentiation.

In vitro treatment of MG63 osteoblast cells with various EVOO phenolic compounds was found to induce cell maturation by increasing the synthesis of ALP and reducing the expression of antigens involved in osteoblast immune functions, which may contribute to improving bone mineral density (Melguizo-Rodríguez, Manzano-Moreno, et al., 2018). Similar effects were observed in osteoblast cells after treatment with extracts of different polyphenol-rich EVOO varieties (Picual, Arbequina, Picudo, and Hojiblanca), observing a greater impact for oils with higher content of phenolic

compounds (Melguizo-Rodríguez, Ramos-Torrecillas, et al., 2018). According to these studies, osteoblast maturation and differentiation can be increased *in vitro* by treatment either with EVOO extracts or with the phenolic fraction isolated from EVOO.

In contrast, an *in vitro* study found that treatment of mesenchymal cells with high doses (100 μM) of hydroxytyrosol reduced the expression of osteoblast differentiation markers and inhibited osteoblastogenesis (Anter, Quesada-Gómez, Dorado, & Casado-Díaz, 2016), while the same dose of apigenin was reported to inhibited osteoblast differentiation markers (Col-I production, ALP, and calcium deposits) in osteoblasts of murine origin (Goto, Hagiwara, Shirai, Yoshida, & Hagiwara, 2015). Previous studies by our group concluded that the dose level is a determinant factor, with high doses having a toxic effect on cells (García-Martínez et al., 2016).

In the present study, the expression of RANKL was increased by treatment with all studied polyphenols, especially luteolin, while the expression of OPG was increased by apigenin, ferulic acid, and coumaric acid but not by luteolin or caffeic acid. RANKL belongs to the family of the tumor necrosis factor (TNF) ligand and is expressed on mesenchymal cells, preosteoblasts, and T cells. The binding of RANKL with its receptor (RANK) stimulates osteoclast activation and differentiation (Ikeda, Utsuyama, & Hirokawa, 2001). OPG is a RANKL receptor that inhibits osteoclast differentiation and function, because its interaction with RANKL can prevent it from binding to RANK (Khosla, 2001). The increased expression of these markers and the higher OPG/RANKL ratio may result from activation of the Wnt canonical signaling pathway, which would favor bone tissue formation (Z. Hu et al., 2015). Phenolic compounds from various vegetable species have been found to promote osteoblast differentiation through the

expression of these markers, which are closely related to bone maturation (Kim, Song, & Hwang, 2014; Satué, Arriero, Monjo, & Ramis, 2013; Srivastava, Bankar, & Roy, 2013; Xiao, Fung, et al., 2014; Xiao, Gao, et al., 2014).

Recent animal studies confirmed that various phenolic compounds in different vegetable species (e.g., eugenol or salicylic acid) exert beneficial effects on bone (Abuhashish et al., 2018; Tanaka et al., 2017). Further *in vivo* studies are required to verify our *in vitro* findings on the effects on bone metabolism of the phenolic compounds in EVOO.

In conclusion, EVOO phenolic compounds exert a stimulatory effect on markers involved in osteoblast proliferation, differentiation, and maturation, and further research is warranted to explore their usefulness in the management of bone disease.

REFERENCES

1. Sofi F, Abbate R, Gensini GF, Casini A. Accruing evidence on benefits of adherence to the Mediterranean diet on health: an updated systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* noviembre de 2010;92(5):1189-96.
2. Brown L, Poudyal H, Panchal SK. Functional foods as potential therapeutic options for metabolic syndrome. *Obesity Reviews* [Internet]. 2015 [citado 9 de octubre de 2018];16. Disponible en: <https://www.readcube.com/articles/10.1111/obr.12313>
3. Pérez-Jiménez F, Ruano J, Perez-Martinez P, Lopez-Segura F, Lopez-Miranda J. The influence of olive oil on human health: not a question of fat alone. *Mol Nutr Food Res.* octubre de 2007;51(10):1199-208.

4. Kanakis P, Termentzi A, Michel T, Gikas E, Halabalaki M, Skaltsounis A-L. From olive drupes to olive oil. An HPLC-orbitrap-based qualitative and quantitative exploration of olive key metabolites. *Planta Med.* noviembre de 2013;79(16):1576-87.
5. Ashwell M. Concepts of functional food. Belgium: International Life Sciences Institute (ILSI); 2002.
6. García-Martínez O, De Luna-Bertos E, Ramos-Torrecillas J, Ruiz C, Milia E, Lorenzo ML, et al. Phenolic Compounds in Extra Virgin Olive Oil Stimulate Human Osteoblastic Cell Proliferation. *PLoS ONE.* 2016;11(3):e0150045.
7. Berrougui H, Ikhlef S, Khalil A. Extra Virgin Olive Oil Polyphenols Promote Cholesterol Efflux and Improve HDL Functionality. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2015;2015:1-9.
8. Casamenti F, Stefani M. Olive polyphenols: new promising agents to combat aging-associated neurodegeneration. *Expert Review of Neurotherapeutics.* 3 de abril de 2017;17(4):345-58.
9. Boss A, Bishop K, Marlow G, Barnett M, Ferguson L. Evidence to Support the Anti-Cancer Effect of Olive Leaf Extract and Future Directions. *Nutrients.* 19 de agosto de 2016;8(8):513.
10. Bernabei R, Martone AM, Ortolani E, Landi F, Marzetti E. Screening, diagnosis and treatment of osteoporosis: a brief review. *Clin Cases Miner Bone Metab.* septiembre de 2014;11(3):201-7.

11. Kanis JA on behalf of the World Health Organization Scientific Group. Assessment of osteoporosis at the primary health-care level. University of Sheffield, UK; (World Health Organization Collaborating Centre for Metabolic Bone Diseases).
12. Johnell O, Kanis JA. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporos Int.* diciembre de 2006;17(12):1726-33.
13. Seeman E. Reduced bone formation and increased bone resorption: rational targets for the treatment of osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2003;14 Suppl 3:S2-8.
14. Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol.* abril de 2007;7(4):292-304.
15. Florencio-Silva R, Sasso GR da S, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int.* 2015;2015:421746.
16. Melguizo-Rodríguez L, Manzano-Moreno FJ, De Luna-Bertos E, Rivas A, Ramos-Torrecillas J, Ruiz C, et al. Effect of olive oil phenolic compounds on osteoblast differentiation. *Eur J Clin Invest.* abril de 2018;48(4).
17. Melguizo-Rodríguez L, Ramos-Torrecillas J, Manzano-Moreno FJ, Illescas-Montes R, Rivas A, Ruiz C, et al. Effect of phenolic extracts from different extra-virgin olive oil varieties on osteoblast-like cells. *PLoS ONE.* 2018;13(4):e0196530.
18. Mousavi SN, Koohdani F, Eslaminejad MB, Izadi P, Eshraghian M, Sayahpour FA, et al. Extra virgin olive oil in maternal diet increases osteogenic genes expression,

but high amounts have deleterious effects on bones in mice offspring at adolescence.

Iran J Basic Med Sci. diciembre de 2016;19(12):1299-307.

19. Wu X, Li Z, Yang Z, Zheng C, Jing J, Chen Y, et al. Caffeic acid 3,4-dihydroxyphenethyl ester suppresses receptor activator of NF- κ B ligand-induced osteoclastogenesis and prevents ovariectomy-induced bone loss through inhibition of mitogen-activated protein kinase/activator protein 1 and Ca²⁺-nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1 signaling pathways. J Bone Miner Res. junio de 2012;27(6):1298-308.
20. Santiago-Mora R, Casado-Díaz A, De Castro MD, Quesada-Gómez JM. Oleuropein enhances osteoblastogenesis and inhibits adipogenesis: the effect on differentiation in stem cells derived from bone marrow. Osteoporos Int. febrero de 2011;22(2):675-84.
21. Ragni E, Viganò M, Rebullà P, Giordano R, Lazzari L. What is beyond a qRT-PCR study on mesenchymal stem cell differentiation properties: how to choose the most reliable housekeeping genes. J Cell Mol Med. enero de 2013;17(1):168-80.
22. Manzano-Moreno FJ, Medina-Huertas R, Ramos-Torrecillas J, García-Martínez O, Ruiz C. The effect of low-level diode laser therapy on early differentiation of osteoblast via BMP-2/TGF- β 1 and its receptors. J Craniomaxillofac Surg. noviembre de 2015;43(9):1926-32.

23. Sun X, Cao Z, Zhang Q, Li M, Han L, Li Y. Aluminum trichloride inhibits osteoblast mineralization via TGF- β 1/Smad signaling pathway. *Chem Biol Interact.* 25 de enero de 2016;244:9-15.
24. Ochiai H, Okada S, Saito A, Hoshi K, Yamashita H, Takato T, et al. Inhibition of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) expression by prolonged transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) administration suppresses osteoblast differentiation. *J Biol Chem.* 29 de junio de 2012;287(27):22654-61.
25. Miron RJ, Saulacic N, Buser D, Iizuka T, Sculean A. Osteoblast proliferation and differentiation on a barrier membrane in combination with BMP2 and TGF β 1. *Clin Oral Investig.* abril de 2013;17(3):981-8.
26. Lieb E, Vogel T, Milz S, Dauner M, Schulz MB. Effects of transforming growth factor beta1 on bonelike tissue formation in three-dimensional cell culture. II: Osteoblastic differentiation. *Tissue Eng.* octubre de 2004;10(9-10):1414-25.
27. Chen M, Dong QR, Huang Q, Xu W, She C. [Effects of 0.5 Gy X-ray radiation on the profile of gene expression in MC3T3-E1 osteoblasts]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 6 de septiembre de 2016;96(33):2659-64.
28. Wu H, Zha Z, Yao P. [Experimental study of icariin in inducing bone marrow mesenchymal stem cell differentiation]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* abril de 2010;30(4):410-5.
29. Canalis E, Economides AN, Gazzerro E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev.* abril de 2003;24(2):218-35.

30. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science*. 12 de noviembre de 1965;150(3698):893-9.
31. Xu B, Wang X, Wu C, Zhu L, Chen O, Wang X. Flavonoid compound icariin enhances BMP-2 induced differentiation and signalling by targeting to connective tissue growth factor (CTGF) in SAMP6 osteoblasts. *PLOS ONE*. 10 de julio de 2018;13(7):e0200367.
32. Liang W, Lin M, Li X, Li C, Gao B, Gan H, et al. Icariin promotes bone formation via the BMP-2/Smad4 signal transduction pathway in the hFOB 1.19 human osteoblastic cell line. *Int J Mol Med*. octubre de 2012;30(4):889-95.
33. Wu J-B, Fong Y-C, Tsai H-Y, Chen Y-F, Tsuzuki M, Tang C-H. Naringin-induced bone morphogenetic protein-2 expression via PI3K, Akt, c-Fos/c-Jun and AP-1 pathway in osteoblasts. *Eur J Pharmacol*. 7 de julio de 2008;588(2-3):333-41.
34. Gaoli X, Yi L, Lili W, Qiutao S, Guang H, Zhiyuan G. [Effect of naringin combined with bone morphogenetic protein-2 on the proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 1 de junio de 2017;35(3):275-80.
35. Hu B, Yu B, Tang D, Li S, Wu Y. Daidzein promotes osteoblast proliferation and differentiation in OCT1 cells through stimulating the activation of BMP-2/Smads pathway. *Genet Mol Res*. 24 de junio de 2016;15(2).

36. Hinoi E, Fujimori S, Wang L, Hojo H, Uno K, Yoneda Y. Nrf2 negatively regulates osteoblast differentiation via interfering with Runx2-dependent transcriptional activation. *J Biol Chem.* 30 de junio de 2006;281(26):18015-24.
37. Franceschi RT, Xiao G, Jiang D, Gopalakrishnan R, Yang S, Reith E. Multiple signaling pathways converge on the Cbfa1/Runx2 transcription factor to regulate osteoblast differentiation. *Connect Tissue Res.* 2003;44 Suppl 1:109-16.
38. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell.* 11 de enero de 2002;108(1):17-29.
39. Lee C-H, Huang Y-L, Liao J-F, Chiou W-F. Ugonin K promotes osteoblastic differentiation and mineralization by activation of p38 MAPK- and ERK-mediated expression of Runx2 and osterix. *Eur J Pharmacol.* 15 de octubre de 2011;668(3):383-9.
40. Xu D, Xu L, Zhou C, Lee WYW, Wu T, Cui L, et al. Salvianolic acid B promotes osteogenesis of human mesenchymal stem cells through activating ERK signaling pathway. *Int J Biochem Cell Biol.* junio de 2014;51:1-9.
41. Wu C-F, Lin Y-S, Lee S-C, Chen C-Y, Wu M-C, Lin J-S. Effects of *Davallia formosana* Hayata Water and Alcohol Extracts on Osteoblastic MC3T3-E1 Cells. *Phytother Res.* septiembre de 2017;31(9):1349-56.

42. Rahman MS, Akhtar N, Jamil HM, Banik RS, Asaduzzaman SM. TGF- β /BMP signaling and other molecular events: regulation of osteoblastogenesis and bone formation. *Bone Res.* 2015;3:15005.
43. Stein GS, Lian JB, Stein JL, van Wijnen AJ, Frenkel B, Montecino M. Mechanisms regulating osteoblast proliferation and differentiation. In *Principles of Bone Biology*. Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. San Diego, Ca. USA: Academic Press; 1996. 69-86 p.
44. Anter J, Quesada-Gómez JM, Dorado G, Casado-Díaz A. Effect of Hydroxytyrosol on Human Mesenchymal Stromal/Stem Cell Differentiation into Adipocytes and Osteoblasts. *Arch Med Res.* 2016;47(3):162-71.
45. Goto T, Hagiwara K, Shirai N, Yoshida K, Hagiwara H. Apigenin inhibits osteoblastogenesis and osteoclastogenesis and prevents bone loss in ovariectomized mice. *Cytotechnology.* marzo de 2015;67(2):357-65.
46. Ikeda T, Utsuyama M, Hirokawa K. Expression profiles of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand, receptor activator of nuclear factor kappaB, and osteoprotegerin messenger RNA in aged and ovariectomized rat bones. *J Bone Miner Res.* agosto de 2001;16(8):1416-25.
47. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology.* diciembre de 2001;142(12):5050-5.

48. Hu Z, Lin D, Qi J, Qiu M, Lv Q, Li Q, et al. Serum from patients with ankylosing spondylitis can increase PPARD, fra-1, MMP7, OPG and RANKL expression in MG63 cells. *Clinics (Sao Paulo)*. noviembre de 2015;70(11):738-42.
49. Satué M, Arriero M del M, Monjo M, Ramis JM. Quercitrin and taxifolin stimulate osteoblast differentiation in MC3T3-E1 cells and inhibit osteoclastogenesis in RAW 264.7 cells. *Biochem Pharmacol*. 15 de noviembre de 2013;86(10):1476-86.
50. Srivastava S, Bankar R, Roy P. Assessment of the role of flavonoids for inducing osteoblast differentiation in isolated mouse bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Phytomedicine*. 15 de junio de 2013;20(8-9):683-90.
51. Xiao H-H, Gao Q-G, Zhang Y, Wong K-C, Dai Y, Yao X-S, et al. Vanillic acid exerts oestrogen-like activities in osteoblast-like UMR 106 cells through MAP kinase (MEK/ERK)-mediated ER signaling pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol*. octubre de 2014;144 Pt B:382-91.
52. Kim M-B, Song Y, Hwang J-K. Kireinol stimulates osteoblast differentiation through activation of the BMP and Wnt/ β -catenin signaling pathways in MC3T3-E1 cells. *Fitoterapia*. octubre de 2014;98:59-65.
53. Xiao H-H, Fung C-Y, Mok S-K, Wong K-C, Ho M-X, Wang X-L, et al. Flavonoids from *Herba epimedii* selectively activate estrogen receptor alpha (ER α) and stimulate ER-dependent osteoblastic functions in UMR-106 cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. septiembre de 2014;143:141-51.

54. Tanaka T, Kawaguchi N, Zaima N, Moriyama T, Fukuta Y, Shirasaka N. Antiosteoporotic activity of a syringic acid diet in ovariectomized mice. *J Nat Med.* octubre de 2017;71(4):632-41.
55. Abuhashish HM, Khairy DA, Abdelsalam MM, Alsayyah A, Ahmed MM, Al-Rejaie SS. In-vivo assessment of the osteo-protective effects of eugenol in alveolar bone tissues. *Biomed Pharmacother.* enero de 2018;97:1303-10.

OBJETIVO 3

Determinar el efecto de los extractos fenólicos de diferentes variedades de aceite de oliva virgen extra (Picual, Arbequina, Picudo y Hojiblanca) sobre la diferenciación, expresión antigénica y capacidad fagocítica de los osteoblastos de la línea celular MG-63.

ABSTRACT

The reported incidence of osteoporosis is lower in countries in which the Mediterranean diet predominates, and this apparent relationship may be mediated by the phenolic compounds present in olive oil. The objective of this study was to determine the effect of phenolic extracts from different varieties of extra-virgin olive oil (Picual, Arbequina, Picudo, and Hojiblanca) on the differentiation, antigenic expression, and phagocytic capacity of osteoblast-like MG-63 cells. At 24 h of treatment a significant increase in phosphatase alkaline activity and significant reductions in CD54, CD80, and HLA-DR expression and in phagocytic activity were observed in comparison to untreated controls. The *in vitro* study performed has demonstrated that phenolic compounds from different extra virgin olive oil varieties can modulate different parameters related to osteoblast differentiation and function.

Keywords

Olive oil extracts; osteoblasts; differentiation; antigenic expression; phagocytosis.

INTRODUCTION

Osteoporosis affects elderly men and women world-wide and is becoming increasingly frequent as people live longer. Non-pharmacologic approaches to bone health improvement include dietary measures, notably adherence to a diet rich in protein, fruits, and vegetables, such as the Mediterranean diet [1]. Olive oil is considered the main fat source in this dietary model and is highly appreciated for its characteristics and nutritive properties. The biological properties of phenolic compounds in extra virgin olive oil (EVOO) are well documented [2] and are likely to account for its positive effects. These compounds have been found to reduce the risk of coronary disease [3], cancer [4,5], atherosclerosis, and stroke [6], among other diseases. The consumption of olive oil and olive polyphenols has also been found to prevent bone mass loss in animal and cell models, which may be attributable to their induction of a reduction in oxidative stress and inflammation, although published results have not been wholly consistent [7–11]. Our group previously demonstrated that human MG-63 osteosarcoma cell growth and differentiation were induced by EVOO [9,12]. The amount of polyphenols varies among EVOOs depending on the geographic area [13–16], agro-climatic conditions, degree of fruit ripeness, and the oil extraction process itself [11,17–19]. Thus, oil from olives collected at the end of the harvest period was found to have a smaller effect on osteoblast proliferation due to its lesser total phenolic content [20].

Bone is a complex tissue under continuous remodeling, and osteoblasts are the cells responsible for bone formation and regeneration. They have also been attributed with immunological functions, including the expression of markers associated with antigen-presenting capacity (CD54, CD80, CD86, HLA-DR), allogeneic T-cell

stimulation, phagocytic activity, and cytokine synthesis [21–23]. The presence of certain growth factors, such as transforming growth factor β 1 (TGF- β 1), fibroblast growth factor (FGF-bb), and platelet-derived growth factor (PDGF), has been found to decrease the expression of antigen presentation markers in osteoblasts [24]. Olive oil phenolic compounds modulate these parameters on the osteoblast [12], however, it is unknown whether phenolic extracts, which are rich in these compounds, preserve this functional capacity.

The need of studies that clarify the effect of Mediterranean diet on bone health, in order to establish the role of this diet in the prevention of osteoporosis has been addressed by many authors. In addition to being the predominant source of fat in the Mediterranean diet, virgin olive oil is a source of phenolic compounds with biological properties. However, despite the myriad of potential health benefits of olive oil phenolic compounds, there's no many data published on the possible effects of olive oil phenolic fraction on bone maturation.

Despite of *in vitro* studies limitations our results provide new knowledge about molecular mechanism of action of EVOO phenolic extracts on bone cells, which support the epidemiological evidences which suggest that EVOO could be useful to enhance bone health and prevent osteoporosis.

The objective of this study was to determine the *in vitro* effect of the phenolic fraction of different EVOO varieties on the differentiation, antigenic expression, and phagocytic activity of osteoblast-like MG-63 cells. The MG63 cell line is commonly used as an osteoblast model because they share the same characteristics.

MATERIAL AND METHODS

Olives

Olives were hand-picked at the beginning of the harvest from ten 27-year-old olive trees of Picual and Hojiblanca cultivars and ten 16-year-old olive trees of Picual, Arbequina, Picudo, and Hojiblanca cultivars that had been grown, spaced 12 x 12 m², in the experimental farm of the Agricultural Research Training Centre in Cabra (Córdoba, Southern Spain). The olive ripening index was determined according to the international olive oil council (IOOC) and based on the olive skin and pulp color [25]. Only healthy fruits with no kind of infection or physical damage were selected for study.

Oil Samples

EVOO samples were obtained using an Abencor analyzer (Abengoa S.A., Seville, Spain), which reproduces the industrial process at laboratory scale and consists of three basic elements: hammer mill, thermob eater, and pulp centrifuge [26]. The EVOO samples obtained were decanted and stored in amber glass bottles at 4 °C in darkness without headspace until analysis.

Sample Preparation

The phenolic fraction of the EVOO extracts studied has been previously characterized by García-Martínez et al. (2016) [20]. This fraction was isolated using the method proposed by the IOOC [25]. Briefly, this analytical methodology combined olive oil extraction with methanol/water (80/20), ultrasonic bath for 15 min at ambient temperature, and centrifugation at 5000 rpm for 25 min. Next, an aliquot of the

supernatant phase was filtered through a 5-mL plastic syringe using a Millex®-HV PVDF 0.45 µm filter (Millipore Corp, Billerica, MA, USA). Extractions were replicated three times, and phenolic extracts were stored at -20 °C until analysis.

Cell Culture

The human osteosarcoma cell line MG-63 was purchased from American Type Cultures Collection (ATCC, Manassas, VA) and maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Invitrogen Gibco Cell Culture Products, Carlsbad, CA) with 100 IU/mL penicillin (Lab Roger SA, Barcelona, Spain), 50 µg/mL gentamicin (Braun Medical SA, Jaen, Spain), 2.5 µg/mL amphotericin B (Sigma, St Louis, MO, USA), 1 % glutamine (Sigma, St Louis, MO, USA), and 2 % HEPES (Sigma, St Louis, MO, USA) supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Paisley, UK) as described by Díaz-Rodríguez et al. (2009). Cultures were kept at 37 °C in a humidified atmosphere of 95 % air and 5 % CO₂. Cells were detached from the culture flask with a solution of 0.05 % Trypsin (Sigma, St Louis, MO, USA) and 0.02 % ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Sigma, St Louis, MO, USA) and were then washed and suspended in complete culture medium with 10 % FBS. Before each experiment, all cells were grown in estrogen-free media (DMEM without red phenol) for at least 24 h.

Cell treatment with oil extracts

Cells were seeded in 24-well plates at 2×10^4 cells/mL per well in estrogen-free culture medium without FBS and cultured at 37 °C in a humidified atmosphere of 95 % air and 5 % CO₂ for 24 h. The medium was then replaced with DMEM containing prepared phenolic extracts dissolved in fresh culture medium at a concentration of

0.00001 %. All experiments included cells incubated under the same conditions without treatment (controls) and cells incubated with 0.001 % methanol as internal control. Three separate experiments were carried out for each treatment, and every experiment was performed in triplicate.

Alkaline phosphatase activity

The effect on osteoblast-like cell differentiation was assessed by evaluating the alkaline phosphatase (ALP) activity of MG-63 cells cultured for six days in osteogenic medium [28] and then treated with olive oil phenolic extracts at doses of 10^{-6} M for 48 h. ALP activity was quantified using a colorimetric assay (Diagnostic kit 104-LL, Sigma, St. Louis, MO, USA) following Sandrini et al [29]. This assay measures the conversion by ALP enzyme of the colorless substrate p-nitrophenyl phosphate to the yellow product p-nitrophenol, with the color change rate corresponding to the amount of enzyme present in the solution. Standard solutions of p-nitrophenol (0–250 μ M) were prepared from dilutions of a 1,000 μ M stock solution and assayed in parallel. Cells were seeded into 24-well plates at 1×10^4 cells/mL per well and cultured in the osteogenic medium under standard conditions for 7 days. The culture medium was then replaced by a fresh medium, and cells were treated with 10^{-6} M of the olive oil phenolic extracts under study, followed by their culture for 48 h under standard conditions. Untreated cells were used as control group. Finally, the cells were lysed with 0.1 % (v/v) Triton X-100 at 37 °C. Samples were then centrifuged at 1,500 rpm, and the supernatants were stored at -70 °C until their use. ALP activity was determined by using p-nitrophenol phosphate as substrate, adding the cell lysate solution (50 μ L) to 50 μ L of ALP substrate (Sigma, St Louis, MO, USA) and incubating the resulting solution at 37 °C for 45 min in darkness.

128

The enzymatic reaction was stopped by adding 50 μL of 0.1 M NaOH, and absorbance was then measured at 405 nm with a spectrophotometer (Biotek EL \times 800). The total protein content was estimated with a protein assay kit from Bio-Rad Laboratories (Nazareth-Eke, Belgium) using Bradford's method. All samples were run in triplicate, and specific ALP activity was expressed in U/mg cellular protein.

Antigenic phenotype

Antigenic phenotype was studied by flow cytometry at 24 h of culture after treatment with olive oil phenolic extracts. Untreated cells were used as controls. Cells were then detached from the cultured flask by treatment with 0.4 % (w/v) EDTA solution, washed, and suspended in PBS at 2×10^4 cells/mL. Cells were labeled by direct staining with the monoclonal antibodies (MAbs) CD54, CD80, CD86, and HLA-DR (CD54/IOL1b, CD80, CD86, and OKDR, respectively, from Invitrogen Corp, Carlsbad, CA, USA) (Table 1). Aliquots of 100 μL cell suspension were incubated with 10 μL of the appropriate MAb for 30 min at 4 $^{\circ}\text{C}$ in darkness. Cells were washed, suspended in 1 mL PBS, and immediately analyzed in a flow cytometer with diode laser (FASC Canton II, SE Becton Dickinson, Palo Alto, CA, USA) at a wavelength of 488 nm to determine the percentage of fluorescent cells. Untreated cells were used as controls. The percentage of antibody-positive cells was calculated from counts of 2,000–3,000 cells. At least three experiments were run for each antigen in all cultures.

Phagocytic activity

Phagocytic activity was studied by flow cytometry at 24 h of culture after treatment with olive oil phenolic extracts. Untreated cells served as controls. Human
129

MG-63 osteosarcoma cells were detached from the culture flask by treatment with 0.04 % EDTA solution, washed, and then suspended in a complete culture medium with 10 % FBS at 1×10^6 cells/mL. Cells were labeled by direct staining with labeled latex beads, incubating a 100- μ L cell suspension with 200- μ L carboxylated FICT-labeled latex beads with a diameter of 2 μ m (Sigma, St Louis) for 30 min at 37 °C in darkness. Cells were washed, suspended in 1 mL PBS, and immediately analyzed in a flow cytometer (FASC Canton II, SE Becton Dickinson, PaloAlto, CA). Control assays were carried out at 4 °C. Results were expressed as the percentage of cells positive for phagocytosis.

Statistical analysis

Data were expressed as means \pm standard deviation (SD). Analysis of variance (ANOVA) was performed to examine the effects on ALP synthesis of treatment with the different olive oil phenolic extracts in comparison to controls. After Shapiro-Wilk test results showed that study variables were normally distributed, the Student's t-test was used to compare antigenic profile and phagocytic activity between treated and control groups. SPSS 22.0 (IBM, Chicago, IL) was used for the data analysis. $P < 0.05$ was considered significant in all tests.

RESULTS

Effects of olive oil phenolic extracts on ALP of MG-63 osteoblast cells

The ALP activity of osteoblast-like cells cultured in osteogenic medium was significantly increased ($p < 0.05$) by treatment with each EVOO phenolic extract studied in comparison to untreated cells (Figure 1). The greatest effect was obtained with Picual, which produced a 71.05 % increase in ALP activity *versus* untreated cells ($p = 0.015$), followed by Arbequina (69.01 % increase vs. controls, $p = 0.000$).

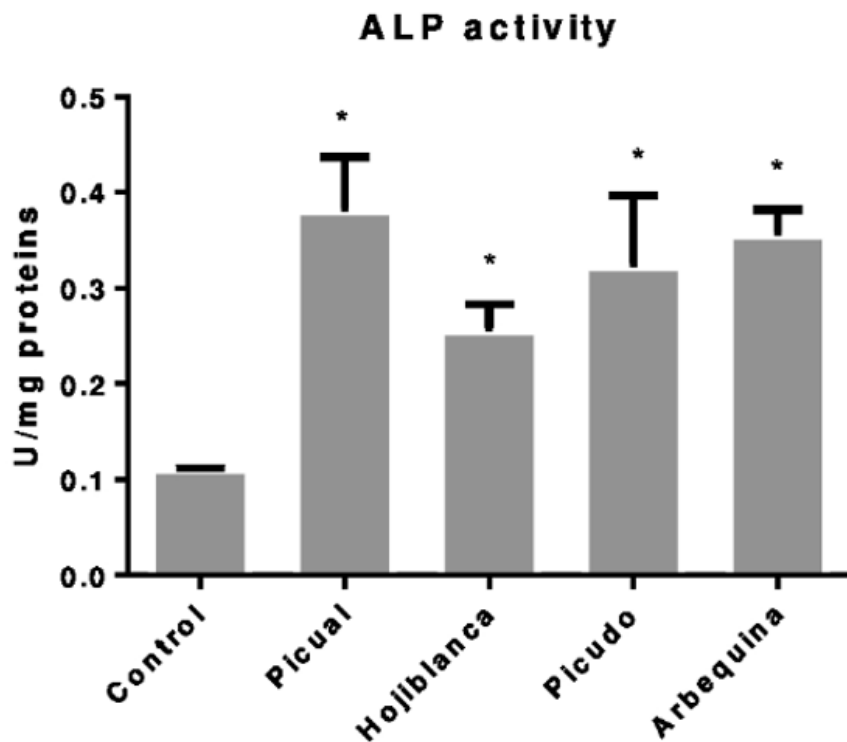


Figure 1. Alkaline phosphatase activity in MG-63 cell line after 48h of olive oil phenolic extract (Picual, Hojiblanca, Picudo and Arbequina) at doses of 10^{-6} M. Data are expressed as U/mg proteins. *Significant difference ($p < 0.05$)

Effect of olive oil phenolic extracts on antigenic phenotype of MG-63 cell line

Figure 2 depicts the flow cytometry results, showing a significantly reduced expression of CD54, CD80, CD86, and HLA-DR membrane antigens *versus* controls in MG-63 cells cultured for 24 h after each olive oil extract treatment with the exception of Hojiblanca or Arbequina varieties, for which no significant difference was found in the expression of CD86 between control and treated cells.

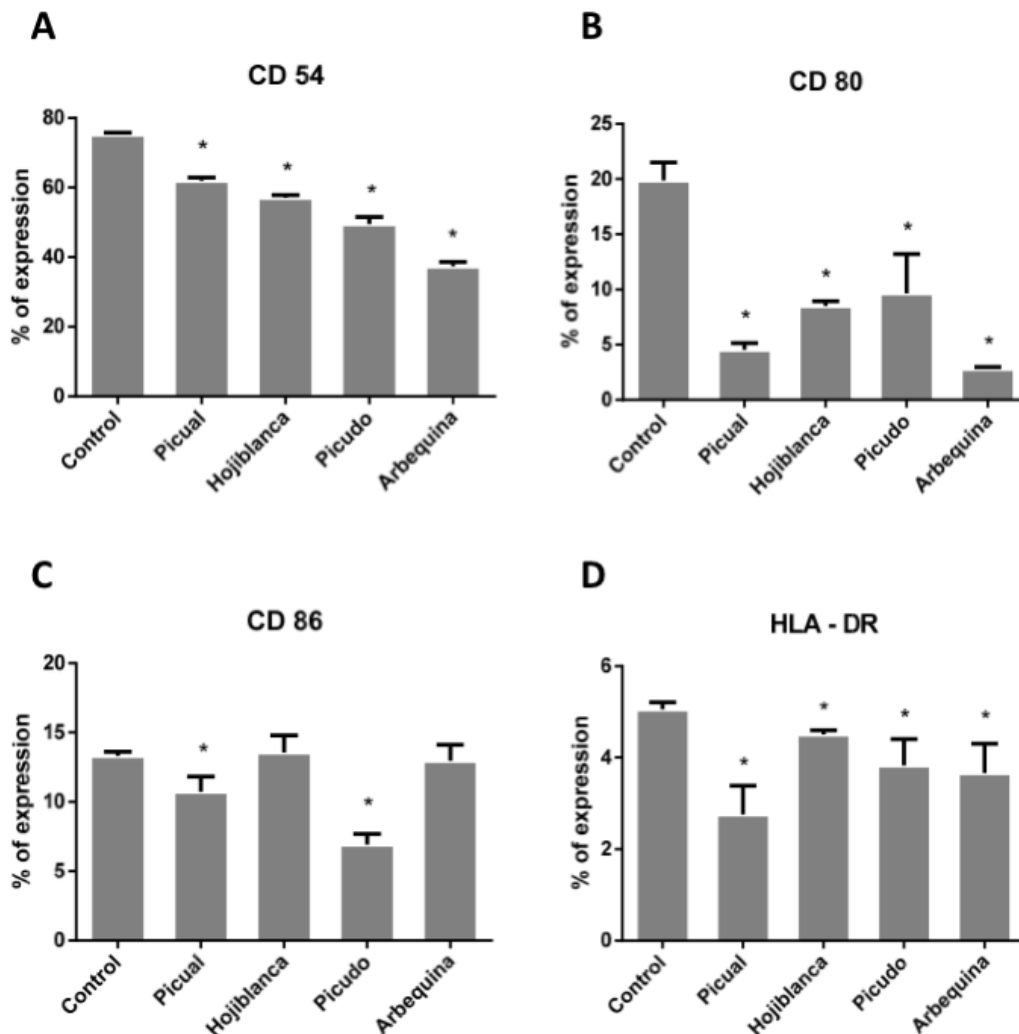


Figure 2. Percentage expression of antigens CD54, CD80, CD86 and HLA-DR in MG-63 cell line after 24 h of treatment with olive oil phenolic extracts. *Significant difference ($p < 0.05$)

Effect of olive oil phenolic extracts on the phagocytic activity of MG-63 cells

Figure 3 shows that the phagocytic activity of MG-63 cells was significantly reduced *versus* untreated controls in cells cultured for 24 h after treatment with EVOO phenolic extracts ($p < 0.05$). The percentage reduction *versus* controls ranged from 62.8 % with Picual to 51.3 % with Hojiblanca.

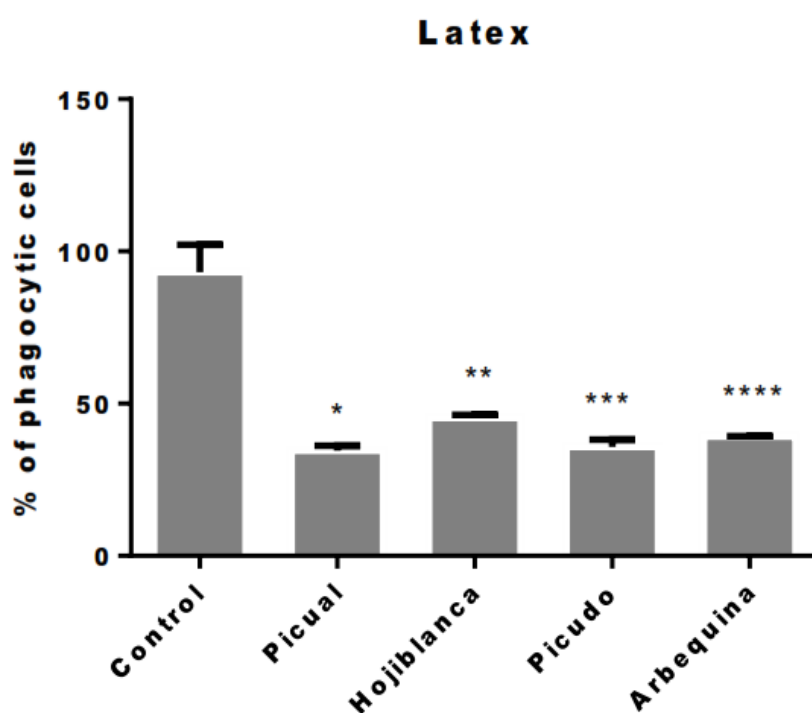


Figure 3. Flow cytometry results for percentage of phagocytic cells in MG-63 cell line at 24 h of olive oil phenolic extracts treatment. Treatment groups: Picual 10^{-6} M, Hojiblanca 10^{-6} M, Picudo 10^{-6} M, Arbequina 10^{-6} M. Control group: not treated cell. * $p=0.007$; ** $p=0.011$; *** $p=0.006$; **** $p=0.009$

DISCUSSION

The main finding of this *in vitro* study is that phenolic extracts from different EVOO varieties can modulate parameters related to osteoblast differentiation.

The expression of CD54, CD80, and HLA-DR on osteoblast-like cells was reduced by treatment with phenolic extracts from every EVOO variety studied. Expression of these antigen presentation markers is known to be modified by the presence of bacterial lipopolysaccharide (LPS), cytokines, growth factors, platelet-rich plasma, and certain pharmaceuticals, among other substances [24,30,31]. Thus, *in vitro* treatment with TGF- β 1 of human osteoblasts obtained by primary culture from bone samples was found to significantly reduce their expression of CD54 and also CD86, although it had no significant effect on their expression of CD80 or HLA-DR [24]. In the latter study, the expression of CD54, CD80, CD86, or HLA-DR was not modulated by treatment with FGFb, PDGF-BB, or IL-2 but was significantly increased by treatment with IL-1 β , IFN γ , or LPS. Ruiz et al [22] also observed that IL1, TNF β 1, or LPS treatment modified the expression of IL-4, IL-12, IL-15, IL-18, and IFN γ on osteoblasts and suggested that their functional capacity is modulated during differentiation and maturation, with a gain in bone-forming function at the expense of their immunological function. The present findings support this proposition, suggesting that phenolic extracts of EVOOs contribute to the bone-forming function of osteoblasts. Variations observed in the effects of extracts from different varieties are consistent with a previous report on their differential impact on cell proliferation [20]. Thus, Arbequina, which produced the greatest reduction in the expression of cell differentiation markers, had shown the lowest effect on proliferative

capacity. This is because the proliferative capacity of the cells decreases with increased maturation/differentiation.

Osteoporosis is a dysregulation of bone remodeling in which the bone resorption rate is greater than the bone formation rate, resulting in bone loss [32]. Etiologic factors implicated in this disease include inflammation and oxidative stress [33], while proinflammatory cytokines, including IL-1 β , IL-6, or TNF- α have been found to promote bone resorption by favoring osteoclast formation [34]. In the present study, treatment of osteoblast-like cells with EVOO phenolic extracts reduced their expression of CD54, CD80, and HLA-DR antigens. This decrease was not related to the presence of proinflammatory cytokines or LPS but was associated with the presence of growth factors that promote osteoblast differentiation or maturation [22,24].

All of the EVOO extracts assayed *in vitro* produced a major and significant increase in ALP activity, suggesting a favorable effect on the maturation of these osteoblast-like cells. Among the four EVOOs studied, the greatest increase was observed with Picual, the variety with the highest phenolic compound content [20]. Extracts from the other three varieties also produced significant increases in ALP activity with respect to controls.

In a murine osteoblast model, Hagiwara et al [10] demonstrated that collagen proliferation and production and ALP activity were increased in MC3T3-E1 cells treated with hydroxytyrosol, tyrosol, and oleuropein, the main phenolic compounds in olive oil. In a study of old ovariectomized rats, Saleh and Saleh [35] found that 12-week treatment with EVOO (1 mL/kg body weight) significantly prevented bone thickness reduction as

assessed by histology findings and ALP activity, and a reduction in their oxidative stress may have played a role.

Phagocytic capacity was observed in a high percentage of MG63 cells but was reported in only 30 % of primary cultures of human osteoblasts from bone samples, and this capacity appears to be related to the degree of cell maturation [23,27]. The phagocytic capacity of MG63 cells was reduced by treatment with the phenolic EVOO extracts, supporting their beneficial effect on osteoblast maturation.

Our *in vitro* data would be related to the results observed in human studies, where it has been described that diets enriched with olive oil increase osteocalcin in serum and the concentrations of P1NP, a bone formation marker [8,36]. However, further investigations are required to have a deeper knowledge about the benefit of phenolic extracts of olive oil in bone tissue.

In conclusion, these findings suggest that phenolic extracts of EVOO contribute to osteoblast maturation, increasing ALP activity and reducing phagocytic capacity and the expression of CD54, CD80, and HLA-DR antigens. Among the four varieties studied, the greatest effects were observed with Picual.

REFERENCES

1. Cauley JA. Osteoporosis: fracture epidemiology update 2016. *Curr Opin Rheumatol.* marzo de 2017;29(2):150-6.
2. Visioli F, Bernardini E. Extra virgin olive oil's polyphenols: biological activities. *Curr Pharm Des.* 2011;17(8):786-804.

3. Martínez-González MA, Salas-Salvadó J, Estruch R, Corella D, Fitó M, Ros E, et al. Benefits of the Mediterranean Diet: Insights From the PREDIMED Study. *Prog Cardiovasc Dis.* agosto de 2015;58(1):50-60.
4. Rotelli MT, Bocale D, De Fazio M, Ancona P, Scalera I, Memeo R, et al. IN-VITRO evidence for the protective properties of the main components of the Mediterranean diet against colorectal cancer: A systematic review. *Surg Oncol.* septiembre de 2015;24(3):145-52.
5. Terzuoli E, Giachetti A, Ziche M, Donnini S. Hydroxytyrosol, a product from olive oil, reduces colon cancer growth by enhancing epidermal growth factor receptor degradation. *Mol Nutr Food Res.* marzo de 2016;60(3):519-29.
6. Servili M, Sordini B, Esposto S, Urbani S, Veneziani G, Di Maio I, et al. Biological Activities of Phenolic Compounds of Extra Virgin Olive Oil. *Antioxidants (Basel).* 20 de diciembre de 2013;3(1):1-23.
7. Chin K-Y, Ima-Nirwana S. Olives and Bone: A Green Osteoporosis Prevention Option. *Int J Environ Res Public Health.* 26 de julio de 2016;13(8).
8. Fernández-Real JM, Bulló M, Moreno-Navarrete JM, Ricart W, Ros E, Estruch R, et al. A Mediterranean diet enriched with olive oil is associated with higher serum total osteocalcin levels in elderly men at high cardiovascular risk. *J Clin Endocrinol Metab.* octubre de 2012;97(10):3792-8.
9. García-Martínez O, Mazzaglia G, Sánchez-Ortiz A, Ocaña-Peinado FM, Rivas A. Phenolic content of Sicilian virgin olive oils and their effect on MG-63 human

osteoblastic cell proliferation. *Grasas y Aceites*. 30 de septiembre de 2014;65(3):032.

10. Hagiwara K, Goto T, Araki M, Miyazaki H, Hagiwara H. Olive polyphenol hydroxytyrosol prevents bone loss. *Eur J Pharmacol*. 15 de julio de 2011;662(1-3):78-84.
11. Puel C, Mardon J, Agalias A, Davicco M-J, Lebecque P, Mazur A, et al. Major phenolic compounds in olive oil modulate bone loss in an ovariectomy/inflammation experimental model. *J Agric Food Chem*. 22 de octubre de 2008;56(20):9417-22.
12. Melguizo-Rodríguez, L, Manzano-Moreno FJ, De Luna-Bertos E, Rivas A, Ramos-Torrecillas J, Ruiz C, et al. Effect of olive oil phenolic compounds on osteoblast differentiation. *Eur J Clin Invest*. 2018;In press.
13. Bakhouché A, Lozano-Sánchez J, Beltrán-Debón R, Joven J, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. Phenolic characterization and geographical classification of commercial Arbequina extra-virgin olive oils produced in southern Catalonia. *Food Research International*. enero de 2013;50(1):401-8.
14. Dabbou S, Rjiba I, Nakbi A, Gazzah N, Issaoui M, Hammami M. Compositional quality of virgin olive oils from cultivars introduced in Tunisian arid zones in comparison to Chemlali cultivars. *Scientia Horticulturae*. 26 de febrero de 2010;124(1):122-7.

15. Taamalli A, Arráez Román D, Zarrouk M, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. Classification of «Chemlali» accessions according to the geographical area using chemometric methods of phenolic profiles analysed by HPLC-ESI-TOF-MS. *Food Chem.* 1 de mayo de 2012;132(1):561-6.
16. Taamalli A, Gómez-Caravaca AM, Zarrouk M, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. Determination of apolar and minor polar compounds and other chemical parameters for the discrimination of six different varieties of Tunisian extra-virgin olive oil cultivated in their traditional growing area. *Eur Food Res Technol.* 1 de octubre de 2010;231(6):965-75.
17. Caruso G, Gucci R, Urbani S, Esposito S, Taticchi A, Di Maio I, et al. Effect of different irrigation volumes during fruit development on quality of virgin olive oil of cv. Frantoio. *Agricultural Water Management.* 1 de marzo de 2014;134:94-103.
18. Farinelli D, Tombesi S. Performance and oil quality of ‘Arbequina’ and four Italian olive cultivars under super high density hedgerow planting system cultivated in central Italy. *Scientia Horticulturae.* 31 de agosto de 2015;192:97-107.
19. García JM, Cuevas MV, Fernández JE. Production and oil quality in ‘Arbequina’ olive (*Olea europaea*, L.) trees under two deficit irrigation strategies. *Irrig Sci.* 1 de mayo de 2013;31(3):359-70.
20. García-Martínez O, Luna-Bertos ED, Ramos-Torrecillas J, Ruiz C, Milia E, Lorenzo ML, et al. Phenolic Compounds in Extra Virgin Olive Oil Stimulate Human Osteoblastic Cell Proliferation. *PLOS ONE.* 1 de marzo de 2016;11(3):e0150045.

21. Reyes-Botella C, Montes MJ, Vallecillo-Capilla MF, Olivares EG, Ruiz C. Antigenic phenotype of cultured human osteoblast-like cells. *Cell Physiol Biochem.* 2002;12(5-6):359-64.
22. Ruiz C, Pérez E, García-Martínez O, Díaz-Rodríguez L, Arroyo-Morales M, Reyes-Botella C. Expression of cytokines IL-4, IL-12, IL-15, IL-18, and IFN γ and modulation by different growth factors in cultured human osteoblast-like cells. *J Bone Miner Metab.* 2007;25(5):286-92.
23. Ruiz C, Pérez E, Vallecillo-Capilla M, Reyes-Botella C. Phagocytosis and allogeneic T cell stimulation by cultured human osteoblast-like cells. *Cell Physiol Biochem.* 2003;13(5):309-14.
24. Pérez E, García-Martínez O, Arroyo-Morales M, Reyes-Botella C, Ruiz C. Modulation of antigenic phenotype in cultured human osteoblast-like cells by FGFb, TGF β 1, PDGF-BB, IL-2, IL-1 β , LPS and IFN γ . *Biosci Rep.* agosto de 2006;26(4):281-9.
25. IOOC. International Olive Oil Council. Madrid; 1984. Report No.: 6.
26. Martínez F, Moyano M., Alba J, Ruiz M., Hidalgo F, Heredia F. Método rápido de obtención de aceite de oliva virgen para determinación de acidez. *International Journal of Fats and Oils.* 1999;50(2):122-6.
27. Díaz-Rodríguez L, García-Martínez O, Arroyo-Morales M, Reyes-Botella C, Ruiz C. Antigenic phenotype and phagocytic capacity of MG-63 osteosarcoma line. *Ann N Y Acad Sci.* septiembre de 2009;1173 Suppl 1:E46-54.

28. Manzano-Moreno FJ, Rodríguez-Martínez JB, Ramos-Torrecillas J, Vallecillo-Capilla MF, Ruiz C, García-Martínez O, et al. Proliferation and osteogenic differentiation of osteoblast-like cells obtained from two techniques for harvesting intraoral bone grafts. *Clin Oral Investig*. junio de 2013;17(5):1349-56.
29. Sandrini E, Morris C, Chiesa R, Cigada A, Santin M. In vitro assessment of the osteointegrative potential of a novel multiphase anodic spark deposition coating for orthopaedic and dental implants. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*. mayo de 2005;73(2):392-9.
30. Díaz-Rodríguez L, García-Martínez O, Morales MA-, Rodríguez-Pérez L, Rubio-Ruiz B, Ruiz C. Effects of indomethacin, nimesulide, and diclofenac on human MG-63 osteosarcoma cell line. *Biol Res Nurs*. enero de 2012;14(1):98-107.
31. García-Martínez O, Reyes-Botella C, Díaz-Rodríguez L, De Luna-Bertos E, Ramos-Torrecillas J, Vallecillo-Capilla MF, et al. Effect of platelet-rich plasma on growth and antigenic profile of human osteoblasts and its clinical impact. *J Oral Maxillofac Surg*. julio de 2012;70(7):1558-64.
32. Feng X, McDonald JM. Disorders of bone remodeling. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:121-45.
33. Manolagas SC. From estrogen-centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. *Endocr Rev*. junio de 2010;31(3):266-300.

34. McLean RR. Proinflammatory cytokines and osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep.* diciembre de 2009;7(4):134-9.
35. Saleh NK, Saleh HA. Olive oil effectively mitigates ovariectomy-induced osteoporosis in rats. *BMC Complement Altern Med.* 4 de febrero de 2011;11:10.
36. Santiago-Mora R, Casado-Díaz A, De Castro MD, Quesada-Gómez JM. Oleuropein enhances osteoblastogenesis and inhibits adipogenesis: the effect on differentiation in stem cells derived from bone marrow. *Osteoporos Int.* febrero de 2011;22(2):675-84.

CONCLUSIONES

1. Los compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva virgen extra (ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido cumárico, luteolina y apigenina) inducen la maduración *in vitro* de los osteoblastos, al aumentar la síntesis de ALP y disminuir la expresión de antígenos involucrados en las funciones inmunes osteoblásticas como son el CD54, CD80, CD86 y HLA-DR, lo que contribuye a favorecer la formación de la matriz extracelular.
2. Los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen extra ejercen un efecto estimulante sobre la expresión génica de marcadores involucrados en la proliferación, diferenciación y maduración de los osteoblastos, lo que sugiere que dichos compuestos pueden desempeñar un papel importante en el metabolismo óseo.
3. Los extractos fenólicos de diferentes variedades de aceite de oliva virgen extra (Picual, Arbequina, Picudo y Hojiblanca) contribuyen a la maduración del osteoblasto aumentando la síntesis de ALP y reduciendo la capacidad fagocítica y la expresión de los antígenos CD54, CD80 y HLA-DR, siendo la variedad picual la que mostró un mayor efecto sobre la maduración del osteoblasto.

CONCLUSIONS

1. The phenolic compounds present in EVOO (caffeic acid, ferulic acid, coumaric acid, luteolin, and apigenin) induce osteoblast maturation *in vitro* by increasing ALP synthesis and reducing the expression of antigens involved in osteoblast immune functions (e.g.; CD54, CD80, CD86, and HLA-DR), which favors extracellular matrix formation.
2. EVOO phenolic compounds have a stimulating effect on the gene expression of markers involved in osteoblast proliferation, differentiation, and maturation, suggesting that these compounds can play an important role in bone metabolism.
3. The phenolic extracts of different EVOO varieties (Picual, Arbequina, Picudo, and Hojiblanca) contribute to osteoblast maturation, increasing ALP synthesis and reducing the phagocytic capacity and expression of CD54, CD80, and HLA-DR antigens. The Picual variety showed the highest effect on osteoblast maturation.