

**REPERCUSIONES DE LOS AINEs SOBRE LAS CÉLULAS
OSTEOBLÁSTICAS**

IMPACT OF NSAIDs ON OSTEOBLASTIC CELLS



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

Víctor Javier Costela Ruiz

Granada 2019

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Víctor Javier Costela Ruiz
ISBN: 978-84-1306-430-7
URI: <http://hdl.handle.net/10481/59377>

ÍNDICE

RESUMEN	5
ABSTRACT	9
MARCO TEÓRICO	12
1. El tejido óseo	12
1.1. Estructura macroscópica del tejido óseo.....	13
1.2. Matriz ósea	14
1.3. Histología ósea.....	23
1.4. Remodelado óseo	46
1.5. Endocrinología ósea.....	48
1.6. Inmunología ósea.....	49
2. Antiinflamatorios no esteroideos	51
2.1. El proceso inflamatorio	51
2.1. Antiinflamatorios no esteroideos	53
2.2. Tipos	54
2.3. Mecanismo farmacológico de acción	55
2.4. Efectos adversos.....	57
2.5. Aines y hueso/osteoblastos	58
BIBLIOGRAFÍA	65
JUSTIFICACIÓN	86
HIPÓTESIS	87
OBJETIVOS	88
RESULTADOS Y DISCUSIÓN/ RESULTS AND DISCUSSION	89
CONCLUSIONES	95

RESUMEN

El tejido óseo es una estructura compleja fundamental en el organismo que cumple diversas funciones, desde aquellas relacionadas con los procesos homeostáticos e inmunes, hasta la función mecánica que le confiere al cuerpo movilidad, estabilidad, soporte y equilibrio. De esta forma, la salud de este tejido contribuye de forma importante a la salud general de la población. Si tenemos en cuenta la variedad de condiciones que influyen en la salud del hueso, podemos mencionar las relacionadas con las características intrínsecas del organismo y las individuales de la persona dada; aunque también existen variedad de condicionantes externos que intervienen de una u otra forma sobre la estructura ósea. Entre los condicionantes exógenos podemos encontrar aquellos que se relacionan con los efectos adversos que desencadenan determinados fármacos.

Dentro de las células que forman parte del tejido óseo, podemos encontrar al osteoblasto. Este puede ser considerado la principal célula productora de hueso, ya que se encarga de la síntesis y ensamblaje de la matriz ósea mediante un proceso conocido como mineralización. Entre las características que presenta este grupo celular encontramos su morfología pseudofibroblástica, su mononuclearidad, la presencia de una serie de marcadores de superficie (CD10, CD13, CD54, CD80, o HLA-DR), la síntesis de distintas proteínas como el colágeno tipo I (Col I) o la fosfatasa alcalina (ALP) y la expresión de genes como el Runx2, la osteocalcina (OSC) o la osteonectina (ON). Todo esto permite una mejor identificación de los osteoblastos. Por otro lado, a estas células se le han atribuido también propiedades inmunológicas, ya que sintetizan citoquinas y tienen capacidad fagocítica y de estimulación de los linfocitos T.

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son un grupo de fármacos usados de forma común en la práctica clínica en diversos procesos relacionados con la

inflamación, la fiebre y los estados álgicos. Estos se clasifican atendiendo a su estructura química y/o a su capacidad de inhibir a los dos principales tipos de isoenzimas principales de ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2). En el campo de la traumatología y la ortopedia, no son pocas las ocasiones en las que los profesionales acuden a la prescripción de estos medicamentos para paliar cuadros derivados de patologías osteoarticulares. Entre los efectos adversos que presentan los AINEs encontramos gastrointestinales, cardiovasculares y renales, entre otros; aunque en los últimos años han sido numerosos los trabajos que han puesto de manifiesto la acción de estos fármacos sobre el tejido óseo, en concreto sobre el osteoblasto.

En este sentido, el objetivo principal planteado en la presente tesis doctoral es el estudio del efecto de distintos AINES, no selectivos de la COX (indometacina, ketoprofeno, diclofenaco, ibuprofeno, ketorolaco, naproxeno y piroxicam) y selectivos de la COX-2 (celecoxib), así como un analgésico (acetaminofén) sobre los osteoblastos humanos en cultivo.

Osteoblastos humanos obtenidos a partir de cultivos primarios de muestras de hueso, fueron tratados durante 24h con dosis de 10 μ M de indometacina, ketoprofeno, diclofenaco, ibuprofeno, ketorolaco, naproxeno, piroxicam y acetaminofén. Posteriormente mediante la técnica de PCR cuantitativa o PCR en tiempo real (RT-qPCR) se procedió al estudio de la expresión de los genes Runx2, Col I, osterix (OSX), OSC, proteínas morfogenéticas 2 y 7 (BMP-2 y BMP-7), el factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β 1) y los receptores del mismo R1, R2 y R3 (TGF β -R1, TGF β -R2, TGF β -R3). De igual modo, dos poblaciones de células osteoblásticas humanas: osteoblastos primarios y células de la línea MG63; fueron tratados con estos mismos fármacos a igual dosis y durante el mismo periodo de tiempo, para proceder a medir la expresión génica de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) mediante RT-qPCR. Por otro lado,

osteoblastos primarios en cultivo fueron tratados con celecoxib, un inhibidor selectivo de la COX-2, a las dosis de 0,75, 2 y 5 μ M durante 24h. En este caso, se determinó el efecto del tratamiento sobre la proliferación, el ciclo celular, la apoptosis, la viabilidad celular y el perfil génico y antigénico.

Los resultados derivados de las diferentes experiencias ponen de manifiesto una disminución en la expresión génica del Runx2, del Col I y la OSX derivada del tratamiento a la dosis de 10 μ M con indometacina, diclofenaco, ibuprofeno, ketorolaco; una reducción en la expresión de las proteínas morfogenéticas BMP-2 y BMP-7 con indometacina, ketoprofeno, diclofenaco, ibuprofeno, ketorolaco, y piroxicam. Sin embargo, el tratamiento con naproxeno, bajo las mismas condiciones, solo redujo la expresión de BMP-7. También se produjo un aumento de la expresión TGF- β 1 como consecuencia del tratamiento con todos los AINEs estudiados, aunque no en el caso de los receptores TGF β -R1, TGF β -R2 y TGF β -R3.

Para el caso del VEGF, cuya expresión fue analizada tanto en osteoblastos primarios humanos y como en la línea osteoblástica humana MG63, se pudo observar un descenso en su expresión en el tratamiento con indometacina, ketoprofeno, diclofenaco, ibuprofeno, ketorolaco, naproxeno y piroxicam en las dos líneas celulares estudiadas.

El tratamiento de osteoblastos humanos obtenidos mediante cultivos primarios con celecoxib a diferentes dosis no mostró efecto sobre el crecimiento celular o la expresión antigénica, aunque si se encontró un descenso en la expresión de los genes Runx2 y OSC.

Estos resultados ponen de manifiesto como un número importante de AINEs no selectivos de la COX pueden modular la expresión de los genes implicados en el crecimiento, la diferenciación/maduración y función del osteoblasto, pudiendo alterar la

fisiología celular y por consiguiente del tejido en el que estas células tienen un papel principal. Sin embargo, el celecoxib un AINE selectivo de la COX-2 solo fue capaz de alterar la expresión de dos genes relacionados con la diferenciación/maduración del osteoblasto, lo que supondría una ventaja de este fármaco a nivel óseo respecto a los restantes AINEs no selectivos de la COX estudiados.

ABSTRACT

Bone tissue is a complex structure of the organism. This tissue plays various roles, from those related to homeostatic and immune processes, to the mechanical function that gives mobility, stability, support and balance. Thus, the health of this tissue contributes significantly to the general health of the population. If we consider the variety of conditions that influence bone health, we can mention those related to the intrinsic characteristics of the organism and the individual features of the person. Besides that, there are also a variety of external conditions that intervene in one way or another on the bone structure. Among the exogenous conditions we can find those that are related to the adverse effects that trigger certain drugs.

Within the cells that are part of the bone tissue, we can find the osteoblast. These cells can be considered the main bone – producing cells, as they are responsible of the synthesis and assembly of bone matrix through a process known as mineralization. Among the characteristics presented by these cell group are its pseudo-fibroblastic morphology; its mononuclearity; the presence of a series of surface markers, such as CD10, CD13, CD54, CD80, or HLA-DR; the synthesis of different proteins such as collagen type I (Col I), or alkaline phosphatase (ALP); and the expression of genes such as Runx2, osteocalcin (OSC) or osteonectin (ON). All of these characteristics allow the identification of this population. On the other hand, they have also immunological properties, since it has been demonstrated their phagocytic capacity, cytokine synthesis and the ability to stimulate T lymphocytes.

Nonsteroidal anti – inflammatory drugs (NSAIDs) are a group of drugs commonly used in the medical field in various processes related to inflammation, fever and pain. In the field of traumatology and orthopedics, there are so many situations in

which professionals prescribe these drugs to alleviate symptoms derived from osteoarticular pathologies. These drugs are classified according to their chemical structure and their ability to inhibit the two main types of isozymes of cyclooxygenase (COX-1 and COX-2). Among the adverse effects of NSADs there are those gastrointestinal, cardiovascular and renal, among others. In recent years there have been numerous works that have revealed the side effect of these drugs on bone tissue, especially on the osteoblast.

In this sense, the main objective of this doctoral thesis is the study of the effect of different NSAIDs on human osteoblasts in culture; those non – selective of COX (indometacin, ketoprofen, diclofenac, ibuprofen, ketorolac, naproxen y piroxicam) and one selective of COX-2 (celecoxib), as well as an analgesic (acetaminofhen).

Human osteoblasts obtained from bone samples by primary culture were treated for 24 hours with a dose of 10 μ M of indometacin, ketoprofen, diclofenac, ibuprofen, ketorolac, naproxen, piroxicam y acetaminophen. We used the quantitative PCR (RT-qPCR) technique, to analyze several genes: Runx2, Col I, OSX, OSC, bone morphogenetic proteins 2 and 7 (BMP-2 and BMP-7), transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) and its receptors R1, R2 and R3 (TGF β -R1, TGF β -R2, TGF β -R3). Likewise, two populations of human osteoblastic cells (primary osteoblast and MG63 line cells) were treated with these same drugs, and time; in order to subsequently measure the gene expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) using RT-qPCR. On the other hand, primary osteoblsts in culture were treated with celecoxib, a selective inhibitor of COX-2, at doses of 0.75, 2 and 5 μ M for 24 hours. In this case, there was determined the effect of the treatment on proliferation, cell cycle, apoptosis, cell viability as well as gene and antigenic profile.

Results derived from the different experiments show: a decrease in the gene expression of Runx2, Col I and OSX because of the treatment with 10 μ M of indometacin, diclofenac, ibuprofen, ketorolac; a reduction in the expression of BMP-2 and BMP-7 with the same those of indometacin, ketoprofen, diclofenac, ibuprofen, ketorolac, y piroxicam. However, treatment with naproxen, under the same conditions, only reduced BMP-7 expression. There was also an increase in TGF- β 1 expression as a result of treatment with all NSAIDs studied, although not in the case of TGF β -R1, TGF β -R2 and TGF β -R3 receptors.

In the case of VEGF, whose expression was analyzed both in human primary osteoblasts and in the human osteoblastic line MG63, we could see a decrease in its expression in the treatment with indometacin, ketoprofen, diclofenac, ibuprofen, ketorolac, naproxen y piroxicam in these two cell lines.

The treatment of human osteoblasts obtained by means of primary cultures with celecoxib at different doses showed no effect on cell growth or antigenic expression, although there was found a decrease in the expression of Runx2 and OSC genes.

Our results show that a significant number of non-selective COX NSAIDs can modulate the expression of genes involved in growth, differentiation/maturation and function of the osteoblast. Thus, these drugs can alter bone cell physiology and the tissue in which the cells have a main role. However, celecoxib, a selective COX-2 NSAID, was only able to alter the expression of two genes related to the differentiation/maturation of the osteoblast, which would be an advantage of this drug at bone level over the remaining non-selective COX NSAIDs studied.

MARCO TEÓRICO

1. El tejido óseo

El esqueleto humano contiene unos 213 huesos que le confieren la estructura de soporte, protección y movimiento. A parte de las características mecánicas que presenta, el hueso también tiene un papel fundamental a nivel bioquímico – inmunológico, participando de forma activa en la homeostasis mineral, manteniendo el equilibrio ácido – base, actuando como depósito de determinados factores de crecimiento, minerales y citoquinas, y sirviendo de barrera protectora a determinados órganos (1,2). Además, hay que tener presente que la médula ósea es la principal responsable de los procedimientos que tienen lugar en el sistema hematopoyético, generando de esta forma todas y cada una de las líneas celulares del sistema hemático (1,3).

El esqueleto humano está compuesto aproximadamente en un 80% de hueso cortical, siendo la parte externa del hueso, y en un 20% por hueso trabecular o parte interna ósea. La parte cortical posee una alta respuesta metabólica a los estímulos mecánicos, ya que las células óseas se encuentran en la superficie de esta, estando cercanas a la circulación de citoquinas y factores de crecimiento. Por su parte, la porción trabecular contiene una red de placas que contienen vasos sanguíneos y médula ósea, teniendo una alta actividad metabólica y gran capacidad de remodelado óseo. Cada una de estas partes está formada, a su vez, por osteonas, conocidas como canales de Havers en la parte cortical (4,5).

La composición del tejido óseo se divide principalmente en dos fases claramente diferenciadas: la matriz inorgánica y la matriz orgánica; suponiendo la primera de estas un 60% del total, un 8 – 10% es agua, y el resto lo compone la matriz orgánica. La composición básica de cada una de estas fases es hidroxapatita para la matriz inorgánica,

Col I y una serie de proteínas para la matriz orgánica, además del componente celular que supone solo el 2% de esta matriz (2).

Estructuralmente, el hueso está cubierto por una vaina de tejido conectivo conocida como periostio que envuelve la superficie externa cortical. Esta vaina se une a la superficie cortical del hueso a través de unas fibras colágenas conocidas como fibras Sharpey, que se extienden hacia el tejido óseo subyacente. La estructura membranosa que cubre las superficies internas del hueso cortical, el hueso trabecular y los canales de los vasos sanguíneos, se conoce como endostio. Así, el endostio está en contacto con el espacio medular, el hueso trabecular y los vasos sanguíneos; conteniendo, a su vez, vasos sanguíneos, osteoblastos y osteoclastos (4,5).

La homeostasis ósea es un proceso activo que está en continua formación – remodelación; viene coordinado por la acción de formación mediada por osteoblastos y por aquella de reabsorción mediada por los osteoclastos. La formación y remodelación ósea está coordinada por las partes cortical y trabecular; siendo las estructuras principales de este proceso el periostio, el endostio, los canales de Havers y las superficies trabeculares (2).

1.1. Estructura macroscópica del tejido óseo

Podemos considerar el conjunto del esqueleto como una estructura compuesta de materiales ensamblados que presentan claras cualidades arquitectónicas. Este conjunto tiene varias funciones, aportando soporte estructural para el resto del cuerpo, actuando a modo de palanca con los músculos para permitir movimiento y locomoción, protegiendo determinados órganos internos a modo de coraza, además de otra serie de procesos bioquímicos que son de gran importancia en la homeostasia del organismo (6).

Existen dos partes principales en el esqueleto: el esqueleto axial en el que están incluidos los huesos de la cabeza y el tronco, y el esqueleto apendicular, donde se encuentran los huesos de las extremidades y la cintura pélvica.

Hay 4 categorías generales para clasificar al hueso atendiendo a la estructura del mismo: huesos largos, huesos cortos, huesos planos y huesos irregulares. Entre los huesos largos podemos encontrar el fémur, húmero, radio, tibia, metatarsos y falanges; originados por una mezcla de hueso endocondral y membranoso. Algunos de los huesos cortos presentes en el cuerpo humano son carpo y tarso, y la rótula. En lo que se refiere a los huesos planos, ejemplos de los mismos son la mandíbula, el esternón y las costillas; estando formados por hueso membranoso. Por su parte, sacro, coxis e hioides son huesos irregulares (2).

Como ejemplo estándar de estructura macroscópica del hueso se presenta al hueso largo, formado por tres partes principales: diáfisis, metáfisis y epífisis. La diáfisis es la parte central del hueso con un eje hueco, compuesta principalmente de hueso cortical denso. La metáfisis es la parte intermedia entre la diáfisis y la epífisis, donde se localizan las placas de crecimiento y suele tener una forma cónico – acampanada. Por su parte, la epífisis es la parte más distal del hueso, con forma redondeada y situada por encima de la placa de crecimiento. Tanto la metáfisis como la epífisis están compuestas por una malla de hueso trabecular envuelto por una fina capa de hueso cortical denso (2).

1.2. Matriz ósea

La matriz ósea es una red compleja organizada que confiere soporte mecánico y ejerce un papel primordial en la homeostasis del hueso. Esta parte del tejido puede liberar moléculas que actúan regulando la función de las células óseas. De esta forma, se le

confiere un papel importante en la remodelación y regeneración del hueso. Por ello, la pérdida de densidad ósea es uno de los principales factores de riesgo de fracturas. En este sentido, cambios en determinadas proteínas de la matriz aportan datos importantes en la predicción de fracturas (2).

1.2.1. Matriz inorgánica

La matriz inorgánica está formada por cristales de un mineral que se conoce como hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10} [\text{PO}_4]_6 [\text{OH}]_2$), compuesto principalmente de fosfato e iones de calcio unidos para formar el mineral. Sin embargo, en el tejido óseo podemos encontrar otra serie de iones, como el bicarbonato, el sodio, el potasio, el citrato, el magnesio, el carbonato, el zinc, el bario y el estroncio (2,7). El mineral óseo juega un papel muy importante en la homeostasis de los iones calcio, magnesio y fosfato (8,9). Existen otras fases minerales en el hueso, como el fosfato osteocálcico, aunque la evidencia actual pone de manifiesto como la mayor parte de la fase mineral de este tejido está formada por cristales de hidroxiapatita, entre los que conviven numerosas impurezas (10).

La fuerza mecánica del hueso se debe, en gran medida, a la parte mineral del mismo, que hace que la zona orgánica del tejido se torne rígida.

1.2.2. Matriz orgánica

La fase orgánica del tejido óseo presenta variadas e importantes funciones, no solo en lo que se refiere a la influencia que ejerce sobre la estructura del hueso, sino sobre las propiedades mecánicas y bioquímicas del mismo. Biomoléculas como las proteínas colágenas, y proteínas no colágenas como la OSC, la osteopontina (OPN), la ON, la fibronectina, la sialoproteína ósea II (BSP II), las proteínas morfogenéticas (BMPs) y los

factores de crecimiento, además de otros fosfo y proteolípidos; tienen un papel primordial tanto sobre la densidad total ósea como sobre la función biológica del mismo (2). Por otro lado, existen pequeños proteoglicanos ricos en leucina, como el agregan, el versican, la decorina, el biglican, la fibromodulina, la osteoadherina y la osteoglicina (2,7,11,12).

Las proteínas colágenas son aquellas que se presentan en mayor porcentaje en el tejido óseo, representando el 90% de las proteínas estructurales presentes. Estas actúan como un eje vertebrador que asiste a la deposición inicial y organización de los minerales de crecimiento óseo, mediante la organización de una estructura adecuada y apropiada de los centros principales de mineralización (2).

El grupo de proteínas colágenas está formado por unos 23 tipos de proteínas distintas y 38 cadenas α genéticamente diferentes, de las cuales 4 aún están por caracterizar e identificar. Atendiendo a sus características estructurales, podemos dividir estas proteínas en dos grupos principales: proteínas colágenas fibrilares y proteínas colágenas no fibrilares. Algunas de las proteínas colágenas fibrilares son, el colágeno tipo I, II, III, V y XI; siendo la forma más abundante, el Col I (13).

El Col I se encuentra principalmente en piel, tendones y hueso; formando parte de la configuración estructural de todos los tejidos conectivos, excepto del cartílago (7). Este tipo de colágeno se deriva de su precursor, conocido como el precolágeno (14). Las fibras colágenas formadas por este, se alinean de una forma escalonada en diferentes niveles, donde se originan huecos dentro de las fibras estructurales que dan lugar a la formación de los primeros cristales. Por tanto, la fracción inorgánica de la matriz junto con las proteínas colágenas, forman un conjunto estructurado para la deposición de la hidroxiapatita, siendo esta asociación la responsable de la resistencia y rigidez del tejido óseo (7,15,16).

La síntesis de Col I a nivel óseo está regulada por el incremento de los niveles de heparina, fosfato orgánico, IL-4 y galio; estando la producción disminuida por la prostaglandina E₂, 1,25 – hidroxivitamina D₃, cortisol, hormona paratiroidea (PTH), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos IL-10 y plomo (7). Por su parte, las concentraciones del péptido precolágeno se ven disminuidas por los tratamientos antiresortivos, como los estrógenos y los bisfosfonatos; e incrementados por agentes anabólicos como la teriparatida (hormona paratiroidea recombinante) (17,18). Por otro lado, dependiendo de la concentración y nivel de maduración celular, la dexametasona puede también incrementar o disminuir los niveles de producción de colágeno (19,20). La importancia del Col I en el tejido óseo se basa principalmente en su relación directa con la fragilidad del tejido cuando existen alteraciones en su producción (21,22).

Existen otra serie de proteínas no colágenas presentes en el hueso con importantes y variadas funciones a nivel bioquímico que aportan un papel fundamental en la mineralización de la matriz. Entre ellas destacan por su presencia y función, la fosfatasa alcalina (ALP), ON, trombospondina (TSP1), fibronectina, OPN, BSP, y OSC (2).

La ALP es una enzima de membrana presente en la mayor parte de los tejidos del organismo. Esta enzima está compuesta por 4 isoformas presentes en la circulación: intestinal, placentaria, la presente en las células germinales, y una isoforma no específica. Los genes de esta última isoforma codifican las formas de ALP de riñón, hígado y hueso; siendo más predominante la ósea durante la infancia y adolescencia y permaneciendo relativamente estables la forma ósea y hepática en la etapa adulta. Estudios realizados en cultivos *in vivo* e *in vitro* con células humanas y murinas han mostrado que entre los factores que regulan la producción de ALP se encuentran la 1,25 – hidroxivitamina D₃, el ácido retinoico y la dexametasona de forma conjunta con el ácido ascórbico y el β

glicerolfosfato; los cuales promueven la actividad de esta enzima (2). Por otro lado, la actividad del plomo y de la IL-10, disminuyen la actividad de la ALP (23). Los estudios llevados a cabo por Roach HI (24) ponen de manifiesto que la expresión de la ALP es un proceso anterior a la mineralización, manteniéndose durante las etapas iniciales de la deposición de los cristales de hidroxiapatita, lo que sugiere un papel clave de la ALP en la deposición de minerales.

La ON se expresa en diversos tejidos en desarrollo y en muchos tipos celulares. Esta proteína no colágena puede constituir en el hueso hasta el 15% del total de estas, dependiendo de la etapa de desarrollo (25). Los factores que influyen en la producción de ON no están claros, aunque se ha observado en cultivos de células óseas bovinas que esta molécula empezaba a aparecer en fases tempranas para mantenerse alta en las posteriores. El TGF β , ejerce una acción variable sobre la ON, mostrando en ocasiones un efecto estimulante y otras depresor. La expresión de la molécula no ha demostrado verse afectada por ningún tratamiento, poniéndose de manifiesto aumentos moderados en presencia de dexametasona y ácido retinóico entre otros (2). La ON y algunos de sus productos se unen a los colágenos tipo I, III y V, y a la TSP1, conocida por ser un organizador de la matriz ósea. Esto sugiere el papel de la proteína en la formación de osteoide óseo (2). Estudios recientes en ratones con osteopenia han puesto de manifiesto una pérdida de hueso trabecular asociada a una reducción en la tasa de formación ósea y su posible asociación con el déficit de ON, lo que podría relacionar a esta con la formación de hueso (26,27). Otras investigaciones muestran como la asociación de la ON al colágeno desnaturalizado, produce la unión de esta a los iones calcio y fosfato, sugiriendo un papel de la ON en la deposición de minerales (28). Por otro lado, la distribución que tiene la molécula dentro del hueso hace pensar que no existe relación con el inicio del proceso de mineralización (29,30). La ON se expresa en tejidos tanto en tejidos

conectivos duros como blandos, y se acumula dentro de la matriz mineralizada. Realmente, el papel de esta proteína está por determinar, pudiendo actuar sobre la regulación en la producción y el crecimiento de los cristales minerales o, simplemente acumularse dentro del tejido mineralizado por su afinidad a la hidroxiapatita (31).

La TSP1 es un angiogénico endógeno con funciones a nivel de la migración, la adhesión y la proliferación celular. Forma parte de un grupo de glicoproteínas modulares que se encuentran en menor proporción en la matriz mineralizada ósea, participando en la organización de la misma (2). Está presente también en una gran variedad de tejidos conectivos, en especial en áreas de demarcación (32). La síntesis de TSP1 se inhibe por la dexametasona y se incrementa con el TGF β (33–35). Las funciones exactas de esta molécula no son del todo conocidas en la actualidad, aunque sí se sabe que ejerce una función en el desarrollo y la remodelación del tejido óseo (36). Por otro lado, estudios *in vitro* han demostrado que posee capacidad de unión a la decorina, de regulación de la fibrilógenesis del colágeno, y de interferencia en la unión celular a la fibronectina; además de poder unirse a ciertos factores de crecimiento como el TGF β , sirviendo posteriormente como señales celulares (2). En lo que se refiere a la remodelación ósea, estudios *in vivo* en ratones han puesto de manifiesto como la TSP1 juega un papel importante en el mantenimiento de la integridad de la matriz ósea y en la regulación de la formación de osteoclastos, células con una implicación directa en el proceso de regeneración – remodelación ósea (37).

La fibronectina es una de las proteínas con mayor presencia en la matriz ósea extracelular y la que más presencia tiene en el suero. Es producida por las células de los tejidos conectivos en algún momento del desarrollo y se acumula en las matrices extracelulares del organismo (32,38). Sobre la síntesis de fibronectina y los factores que regulan la misma en el tejido óseo no hay mucha información, aunque estudios *in vitro*

en rata y en humano, han demostrado que el TGF β y la PTH favorecen el aumento en la producción de la misma (39). Por su parte, se ha visto como los estrógenos favorecen una disminución en la expresión de los niveles de esta proteína, cuando los cultivos son estimulados con PTH; no encontrándose efecto en aquellos estimulados con TGF β (40). Por otro lado, el nitrato de galio, cuyas propiedades en el aumento de la masa del tejido óseo son conocidas, estimula la producción de fibronectina en cultivos *in vitro* de calvaria de rata o de células de osteosarcoma ROS17/2.8 (41). En la misma línea, en un estudio *in vivo* realizado en conejos osteoporóticos tratados con hidroxapatita rica en fibronectina, se detectaron valores mayores en los índices de la microarquitectura, el grosor y la separación del hueso trabecular; además de una mayor proliferación celular a las 24 horas y un aumento del tejido conectivo a las 48 horas (42).

La OPN es una glicoproteína cuya síntesis se ve drásticamente aumentada con la transformación celular en asociación con la progresión tumoral (43–45). Modelos *in vitro* con células osteoblásticas de rata pusieron de manifiesto la estimulación de la OPN con 1,25 hidroxivitamina D₃ (46) y el TGF β (47). Por otro lado, se observó una disminución de la expresión de la proteína en tratamientos prolongados con TGF β , indicando, a su vez, una disminución en el fenotipo osteoblástico. Por otro lado, la síntesis de OPN puede verse aumentada con la dexametasona y la PTH (2). Análisis secuenciales ponen de manifiesto como la OPN, entre otras sialoproteínas, tienen características estructurales adecuadas para la interacción con la hidroxapatita; demostrando como esta molécula se une a la hidroxapatita con alta especificidad y afinidad (48–50). Además, se ha demostrado la importancia de los residuos fosfato en la afinidad de la proteína a la hidroxapatita, además de explicar cómo el nivel de fosforilación de la OPN procedente de diferentes tejidos puede tener variados efectos en la formación y crecimiento mineral

(2). La acción conjunta con otras proteínas no colágenas como la OSC, tiene un papel importante y determinante sobre el tamaño, la forma y la fuerza del tejido óseo (51).

Junto con la OPN, la BSP es otra de las proteínas no colágenas que se acumula en el cemento y en los espacios entre las fibras de colágeno mineralizadas (52–54). Se trata de una proteína algo más específica del hueso que la OPN, que puede suponer hasta el 10% de las proteínas no colágenas del tejido óseo, dependiendo del tipo de hueso de que se trate (52,54,55). Se ha demostrado que la utilización de 1,25-hidroxivitamina D₃ disminuye su síntesis, al contrario de lo que ocurre con la OPN (56).

La OSC se encuentra mayormente en el hueso y en la dentina; estando también presente en los megacariocitos de la médula ósea y en las plaquetas. Es metabolizada en el hígado y riñones. Se trata de una proteína colágena pequeña cuya síntesis está estimulada por el 1,25-hidroxivitamina D₃ y 22-oxa-calcitriol (2). En estudios *in vivo* en ratas y en ratones se ha visto la influencia de las BMPs sobre la OSC. Los factores que disminuyen su síntesis son la PTH, los glucocorticoides, el TGFβ, la prostaglandina 2 (PGE₂), las IL1 e IL10, el factor de necrosis tumoral (TNFα). Esta molécula es capaz de unirse a los cristales de hidroxapatita y participar de forma directa en la mineralización de la matriz ósea, siendo un regulador específico de la longitud de los cristales de mineral en el hueso. Los niveles de OSC en suero pueden verse afectados por la presencia de anticoagulantes en plasma (2,57). Por otro lado, como se ha visto anteriormente, la OSC puede tener un papel importante en el desarrollo de los osteoclastos; observándose la importancia de la misma en la inducción del fenotipo de los mismos (2).

Por su parte, los proteoglicanos son un tipo de macromoléculas que, de igual modo, forman parte de la matriz orgánica del hueso, como son agregan, versican, decorina, biglicano, fibromodulina, osteaderina o osteoglicina.

La más abundante de estas macromoléculas es el agregan, cuya presencia es mayor en el cartílago que en el hueso. Tiene un papel muy importante en el desarrollo esquelético y en el mantenimiento de la matriz ósea (2,58,59).

El versican está presente en niveles muy reducidos en el hueso, siendo incluso inferiores que el agregan. Se detecta de forma expresa durante la osteogénesis (60). Aunque el papel del mismo es muy desconocido, ha sido relacionado con la estimulación de los osteoprogenitores o con la mineralización (61).

Por otro lado, la decorina participa en la regulación del diámetro y la orientación de las fibras colágenas y, posiblemente, en la prevención de la calcificación prematura del osteoide (2). Es producida por los preosteoblastos y los osteoblastos, lo que indica el papel de este proteoglicano en la regulación inicial de la deposición mineral (62).

El biglicano es otro proteoglicano presente en muy pequeña cantidad en el hueso cuyas funciones no se conocen del todo. Participa en la promoción de la formación de apatita, aunque en concentraciones elevadas es capaz de inhibir el crecimiento y la proliferación de los cristales de hidroxiapatita. Su participación puede no estar directamente relacionada con la deposición mineral en el hueso (2,63).

La fibromodulina se encuentra, de igual modo, en pequeñas cantidades en el hueso. Junto con la decorina, son unas de las proteínas colágenas de unión más activas, articulando de forma completa diferentes regiones de las fibras de colágeno (64), pudiendo tener participación en la fibrilogénesis y mineralización del colágeno (65).

La osteaderina se localiza en muy pequeña cantidad en la matriz mineralizada del hueso y en la dentina (66,67). Aunque existen pocos datos sobre esta proteína, se cree que es sintetizada por los osteoblastos, participando en el proceso de adhesión de los mismos

y uniéndose a la hidroxiapatita (68), por lo que se le atribuye también un papel en el proceso de mineralización.

En el caso de la osteoglicina, es una de las proteínas menos conocidas presentes en muy pequeña cantidad en el tejido óseo, teniendo una expresión en el hueso no tan específica como en el caso de la osteoadherina (2).

Además de todos estos componentes de la matriz orgánica del hueso, existen otra serie de moléculas como las proteínas séricas (albumina) que se unen a la hidroxiapatita y tienen una función en la mineralización; al igual que las metaloproteasas y fosfoproteínas que, de igual modo, tienen una participación en el proceso de mineralización (2).

Otro tipo de factores presentes en el hueso son los factores de crecimiento y las citoquinas. De entre las más importantes y destacadas están el TGF β , el factor de crecimiento insulínico tipo I (IGFI), la osteoprotegerina (OPG), el interferón γ , los TNFs, las IL (principalmente IL1 e IL6), y las BMPs 2 – 10 (2,69). Todos estos factores tienen una importancia primordial a nivel celular en lo relativo a la diferenciación, activación, crecimiento y renovación celular; por lo que se abordarán de nuevo en la parte correspondiente.

1.3.Histología ósea

El hueso es un órgano altamente activo en continuo proceso de formación – resorción; proceso coordinado en la matriz ósea por dos grupos celulares principales, los osteoblastos y los osteoclastos (70). Por su parte, los osteocitos parecen actuar como mecanosensores y precursores en el proceso de formación – resorción. Otro grupo celular presente en el hueso son las conocidas como células de revestimiento óseo, cuyo papel

dentro del tejido no está claro, aunque parecen estar implicadas en el proceso mediado por los osteoblastos – osteoclastos (7).

1.3.1. Osteoblastos.

Los osteoblastos son células de tejido conectivo mononucleadas, con características morfológicas similares a los fibroblastos y con capacidad de adherencia al plástico en cultivos *in vitro*. Este tipo celular representa entre el 4 y el 6% de las células presentes en el hueso. Son células con forma cuboide que cubren las superficies activas del tejido óseo, cuya función principal es la producción de hueso nuevo a través de la síntesis y ensamblaje de la matriz ósea. Este grupo celular proviene de las células madre mesenquimales (MSCs), células precursoras de diferentes tipos celulares que, en el caso del hueso, se sitúan a nivel de la superficie y son capaces de diferenciar a línea osteogénica (71).

Algunos de estos osteoblastos maduros alcanzan el punto a osteocitos o a células de revestimiento óseo mediante un proceso de diferenciación unido a una apoptosis programada (72,73). En el interior de las vacuolas de los osteoblastos pueden encontrarse estructuras ovoides y redondeadas, lo que sugiere que los osteoblastos también pueden ingerir y degradar los cuerpos apoptóticos durante la formación de hueso alveolar (74).

1.3.1.1. Identificación osteoblástica.

Existen diferentes caminos para proceder a la identificación de los osteoblastos aunque, generalmente, se acude a varios para poder hacer una caracterización más certera de estas células. Las formas más comunes de tipificar a los osteoblastos se realizan a través de la identificación morfológica, identificación bioquímica, antigénica y genética.

Identificación morfológica.

Cuando se lleva a cabo la identificación morfológica del osteoblasto, aparece como una célula mononucleada de gran tamaño que suele presentarse en las superficies óseas en génesis. Los osteoblastos son alargados y se asemejan a un cubo o un cilindro con conexiones cortas y finas entre unas y otras células, con gran contenido en glucógeno y con apariencia fibroblástica; pudiéndose clasificar dentro de los grupos celulares encargados de la síntesis de proteínas, con citoplasma azulado por el alto contenido en ARN, retículo endoplasmático áspero, prominente aparato de Golgi, a la vez que varias vesículas secretoras. Presentan un núcleo con nucléolo ampliamente desarrollado y mitocondrias abundantes con forma alargada (7).

La tinción con azul de toluidina se utiliza muy comúnmente para la identificación de los osteoblastos en parafina, donde las secciones con al menos cuatro células cuboides adyacentes son identificadas como superficies pobladas de osteoblastos. Por otro lado, la tinción enzimática para la ALP es otro de los métodos más específicos para la identificación de osteoblastos, en especial cuando se utiliza en combinación con marcadores de mineralización como la calceína (color verde), alizarina (roja) o demeclociclina (amarilla) (75).

Los osteoblastos maduros aparecen en una capa única de células cuboides que contienen un largo y complejo Aparato de Golgi y gran cantidad de retículo endoplasmático rugoso (72). Estos osteoblastos pueden observarse fácilmente en el periostio o en la médula ósea a medida que la célula osteoprogenitora alcanza la superficie del hueso y el fenotipo del osteoblasto es expresado de forma completa. Por su parte, podemos encontrar preosteoblastos formando una o dos capas de células detrás del osteoblasto y cerca de las superficies formadoras de hueso, por lo que suelen estar presentes donde están los osteoblastos activos y maduros (2). En la superficie ósea el

osteoblasto se vuelve aplanado y se convierte en una célula de revestimiento óseo, que está en contacto directo con el osteocito en el interior de la matrix mineralizada a través de los procesos celulares situados en el interior de los canalículos (76). Por tanto, podemos ver como existen cuatro formas del linaje de células osteoblásticas *in vivo*: preosteoblastos, osteoblastos maduros, osteocitos y células de revestimiento óseo (2).

Identificación bioquímica.

Sobre la identificación bioquímica de los osteoblastos, lo que se utiliza principalmente a este nivel es la medición de la presencia de cierto tipo de proteínas, tanto colágenas como no colágenas mencionadas anteriormente.

De entre las proteínas colágenas, el Col I es la más abundante dentro del tejido óseo. Así, en los tejidos duros el colágeno es producido por células muy especializadas de origen mesenquimal; siendo los osteoblastos en tejido óseo y odontoblastos en caso de la dentina. Las formas de colágeno fibrilar se sintetizan a partir de tres cadenas polipeptídicas que se denominan cadenas α , que se enrollan en una triple hélice para dar lugar a una estructura similar a un cordón. En la tercera posición de la cadena encontramos un residuo de glicina, y en las otras dos posiciones encontramos gran cantidad de prolina e hidroxiprolina (77,78). De este modo, podemos encontrar esta proteína en el osteoblasto ya que es sintetizada, entre otros, por este tipo celular en el proceso de mineralización, permitiendo la formación de los primeros cristales de hidroxiapatita con la estructura fibrilar que crea (7,15).

La 2 – fosfatasa alcalina específica ósea (BALP) se produce en las células osteoblásticas en correlación directamente proporcional a la tasa de formación ósea (14). La ALP en los progenitores celulares marca el camino a la diferenciación celular a línea

osteoblástica, siendo el sello distintivo de la formación de hueso (70). La formación ALP se produce en la parte subperióstica del hueso, con una específica expresión en preosteoblastos y osteoblastos en zonas destinadas a convertirse en hueso nuevo, encontrándose una expresión menor en la matriz mineralizada, lo que pone de manifiesto que este enzima es un marcador específico de células osteoblásticas en etapas no maduras (2,70).

En el caso de la ON, es una glicoproteína que se encuentra en diferentes tipos celulares, entre los cuales se encuentran los osteoblastos. Se sabe que la síntesis de la misma está mediada principalmente por los osteoblastos y los megacariocitos, de ahí que también tenga una presencia importante en los trombocitos. Esta molécula parece tener un papel importante en el proceso de unión de los iones calcio con el Col I (79).

La TSP1 es otra de las proteínas que podemos identificar en los osteoblastos. Su síntesis se produce, entre otros, en las células osteoblásticas. Se han detectado niveles bajos en el periostio, con localización principal en el osteoide en desarrollo en las células osteoblásticas. Su acumulación en la matriz mineralizada es moderada (2).

En cuanto a la OPN, estudios *in vitro* indican esta molécula es capaz de promover la unión de los osteoblastos y osteoclastos, siendo importante para la determinación de las células en la matriz del hueso. Además, esta proteína se acumula mayormente en la matriz. Durante la formación de hueso subperióstico la OPN es producida por los osteoblastos y osteocitos, aunque en estos últimos en menor medida. Todo esto sitúa a la OPN como un marcador tardío de diferenciación de los osteoblastos, siendo temprano en el caso de la mineralización de la matriz (2). Por otra parte, los factores de crecimiento y las hormonas están en estrecha relación con la actividad de esta proteína, estando en consonancia con la mineralización de la matriz (80).

La BSP es sintetizada por los osteoblastos y los condrocitos hipertróficos. Durante la formación del subperióstico, las células osteoblásticas expresan esta proteína, apareciendo justo antes o en coincidencia con la mineralización. De este modo, podría tener un papel importante en el proceso de mineralización y permite la unión celular en los tejidos en los que se expresa. Además, tiene la propiedad de unirse al calcio con una gran afinidad (2). En lo que se refiere a la síntesis de la proteína, esta está coordinada con la etapa en la que los osteoblastos maduran, observándose solo en cultivos en estado de mineralización activa (56).

La OSC es una proteína no colágena sintetizada únicamente en el linaje osteoblástico, aunque hay autores que apuntan a que puede tener un papel importante en la regulación de los osteoclastos y sus precursores. Durante el desarrollo óseo, se produce en cantidades muy bajas, no alcanzando niveles máximos hasta las etapas más avanzadas de la mineralización. Por lo tanto, no se trata de un precursor o inductor de la mineralización, sino de un factor importante en el mantenimiento de la misma y en la determinación del tamaño de los cristales. De esta forma, podemos decir que la OSC es un factor determinante en la maduración ósea, y no en la iniciación de la misma (2,14).

Junto a las biomoléculas anteriormente mencionadas, hay otra serie de sustancias que están presentes en el osteoblasto. Así, el versican participa en la osteogénesis y está presente en este tipo celular, la decorina es producida por los preosteoblastos y los osteoblastos; la osteoadherina también es sintetizada por estas células. Además, existen otra serie de factores de crecimiento y citoquinas en los osteoblastos, como TGF β , IGF, OPG, TNF, IL-1, IL-6; así como los BMPs 2 – 10 (2,60,66,67,69).

Identificación antigénica.

Otro tipo de identificación celular es la identificación antigénica a través del análisis de determinados marcadores de superficie expresados en los osteoblastos. No obstante, hay que señalar que la mayor parte de estos marcadores no son exclusivos del osteoblasto.

Uno de los principales marcadores presentados por los osteoblastos es el CD10, un marcador de superficie conocido como el antígeno de la leucemia linfoblástica aguda. Este antigénico de superficie es una proteína integral de membrana tipo II que se expresa de forma principal en estadios tempranos de los progenitores linfoides, mostrando un fenotipo inmaduro que puede tener un papel en la diferenciación y desarrollo de las células linfoides. Como se ha puesto de manifiesto, este marcador fue descubierto inicialmente en la leucemia linfoblástica aguda, aunque posteriormente se ha podido detectar en células del tejido prostático, renal, intestinal, endometrial, suprarrenal y óseo. La presencia de esta proteína en diversos tejidos pone de manifiesto como la función que tiene a nivel biológico no queda restringida de forma exclusiva a las hemopatías de carácter oncológico (81–85). Sobre su expresión en el tejido óseo, concretamente en los osteoblastos, nuestro grupo de investigación fue pionero en identificar este marcador de superficie en este tipo de células, tanto en cultivos primarios de osteoblastos como en cortes de hueso (85–87). Por otro lado, este mismo grupo ha podido identificar el antígeno en células tipificadas de osteosarcoma de la línea MG63 (88).

Otro de los marcadores comúnmente expresado por los osteoblastos es el CD44. Se trata de una proteína transmembrana no quinasa de un solo intervalo expresada en células madre embrionarias y otros tipos celulares, incluidos tejidos conectivos y médula ósea. Es un receptor del ácido hialurónico que tiene la capacidad de interactuar con otros ligandos, entre ellos la OPN, distintos tipos de colágeno y metaloproteinasas de la matriz

ósea. Por otro lado, se ha puesto de manifiesto la expresión al alza de este marcador en subpoblaciones de células cancerosas y es considerado un marcador molecular para las células madre cancerosas. Estudios recientes han puesto de manifiesto como la sobreexpresión de CD44 induce el crecimiento de las células tumorales y la diferenciación de las células madre tumorales; además de jugar un papel importante en la quimio resistencia y la metástasis (89–92). En referencia a la expresión de esta proteína de superficie en la línea osteoblástica, numerosos autores han puesto de manifiesto la presencia de la misma en estas líneas (86,87,93). A pesar de esto, no se conoce de forma certera en qué momento se manifiesta, distintos estudios muestran su expresión en las diferentes etapas de maduración del osteoblasto, como es el caso de la expresión del marcador encontrada por nuestro grupo en la línea MG63, considerada una línea osteoblástica no madura. No obstante, la mayor parte de los autores coinciden en que se presenta en el osteocito (4,88,94,95).

Otros marcadores comúnmente expresados por los osteoblastos son el CD13, CD54, CD80, CD86 y HLA-DR (86–88,93).

El CD13 es una aminopeptidasa neutra conocida como proteína de membrana de tipo II, con dominio de metaloproteasa dependiente de zinc extracelular. Inicialmente fue identificada como una proteína de superficie presente en células mieloides, aunque desde ese momento se ha venido encontrando en otros tipos celulares como los linfocitos, células epiteliales del riñón e intestino, células endoteliales y sinoviocitos (96,97). Las funciones del CD13 son variadas, aunque en líneas generales se dividen en escisión enzimática de péptidos, endocitosis y transducción de señales. Sobre su papel a nivel inmunológico, cabe destacar como el uso de anticuerpos específicos CD13 ha puesto de manifiesto su participación en la transducción de señales a nivel celular. Por otro lado, también se ha demostrado su acción sobre los macrófagos y las células dendríticas (98–

101). Su presencia en osteoblastos se ha evidenciado en estudios *in vivo* (86); así como en la línea tumoral de osteosarcoma MG63 (87).

En referencia al CD54, se trata de una molécula de adhesión intercelular y miembro de la familia de las inmunoglobulinas que se encarga de mediar en las interacciones célula – célula, dependientes de la adhesión. Este puede ayudar al movimiento de las células a través de la matriz extracelular. Por otro lado, desempeña un papel importante en la invasión de las células de cáncer de pulmón, en el pronóstico desfavorable de la leucemia linfática crónica y en la enfermedad de Hodgkin (102–107). Este antígeno, junto a otros como el CD80, CD86, CD44 y HLA-DR juegan un papel muy importante en determinados mecanismos relacionados con la presentación antigénica y la activación de las células T. Es el antígeno de clase II HLA-DR, además de una señal coestimulante llevada a cabo por CD80 y CD86, lo que desencadena la activación de las células T, por medio de la señal de las células presentadoras de estos antígenos. En su caso, el CD44 y el CD54 actúan como complemento de esta señal de estimulación. Como en el caso de los marcadores anteriormente indicados, CD44, CD54, CD80, CD86 y HLA-DR se expresan tanto en células osteoblásticas, así como en aquellas de la línea MG63; aunque ciertamente cabe destacar que su porcentaje de expresión es inferior a los citados en párrafos anteriores (86–88,93,108).

Otros antígenos expresados por los osteoblastos aunque en porcentaje menos significativo que los anteriores son: los marcadores típicos de línea hematopoyética como en CD34, aunque el antígeno CD45 si resulta negativo en esta población celular; los pertenecientes al linaje de los linfocitos B como el CD20 y el CD23, no siendo así en el caso del CD19; el CD56, que es un antígeno de las células Natural Killer, otros antígenos de la línea mielomonocítica como el CD11b, CD16 y CD36, además del CD13 ya

mencionado; siendo la expresión negativa para otros marcadores del mismo linaje como CD14, CD15 y CD33. Así mismo, expresan los antígenos CD25 y CD38 (86).

Identificación genética

La expresión de forma secuencial de determinados genes específicos de tejido y aquellos relacionados con el crecimiento celular son útiles para la identificación de cada una de las etapas de desarrollo de las mismas a través del estudio del fenotipo de determinadas células del tejido óseo. Los cultivos celulares primarios ofrecen varias ventajas sobre la identificación de los mecanismos moleculares o nuevos marcadores de poblaciones osteogénicas. Podemos definir cuatro periodos de desarrollo principales a través de la expresión de algunas de las proteínas de matriz ósea relacionados con las células del linaje osteobástico. En un periodo inicial, la proliferación supone un soporte a la expansión de las células preosteoblásticas para la formación de un nódulo celular de múltiples capas. En esta etapa los genes que participan en la activación de la misma y la progresión del ciclo celular, se expresan de forma conjunta con aquellos genes que codifican los factores de crecimiento, como el FGF, IGF-1, TGF β , BMP, proteínas como la fibronectina y Col I, que es el componente principal de la matriz extracelular ósea para el apoyo del crecimiento y la diferenciación de los osteoblastos. En BMP-2, que se expresa mayormente en las etapas iniciales y favorece la expresión de BMP-3 y BMP-4 para la posterior etapa de mineralización (2).

Teniendo en cuenta que los osteoblastos se derivan de las poblaciones de linaje mesenquimal que dan lugar al estroma de determinados tejidos sobre los que se asienta el parénquima, podemos determinar una serie de marcadores genéticos que nos permiten identificar la línea osteoblástica en sus diferentes etapas de maduración.

En este sentido, para el compromiso osteogénico de las MSCs se requiere la manifestación de una serie de pasos en los que participan determinados genes específicos. Aquí se incluye la síntesis de BMPs y miembros de las vías Wingless (Wnt). La expresión de los factores de transcripción: Run-related transcription factor (Runx2 o CBFA1), distal-less homeobox 5 (Dlx5) y OSX son determinantes en la diferenciación a osteoblastos. Así, el gen Runx2 es el gen maestro en la diferenciación a esta línea celular demostrado mediante el hecho de que ratones con bloqueo en la expresión del mismo carecen de osteoblastos. Este gen ha mostrado ser parte principal en la regulación de genes relacionados con esta línea celular como ColA1, ALP, BSP, BGLAP y OSC. Con el establecimiento del grupo de progenitores de osteoblastos que expresan Runx2 y ColA1, se comienza una fase de proliferación. Esta es la fase en la que estas células expresan ALP y son considerados preosteoblastos (70,109–112).

En el proceso de transición de osteoblastos a osteoblastos maduros comienza a tomar un papel importante la expresión de OSX, así como la síntesis de una serie de proteínas de la matriz como la OSC, la BSP I y II y el Col I (60,110,113,114).

Otros como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), microRNAs y conexas también desempeñan una importante función en el proceso de diferenciación (115–118).

En los pasos que determinan la síntesis de la matriz ósea existe un primer punto en el que los osteoblastos sintetizan proteínas colágenas como el Col I y otras no colágenas como OSC, ON, BSP II y OPN; así como proteoglicanos como la decorina y el biglicano (119,120).

Sobre los niveles de expresión de cada uno de estos marcadores a lo largo de la diferenciación de MSCs con medio osteogénico, cabe destacar el pico en el día +9 en

ALP y Runx2. Col I permanece en niveles altos con un pico en el día +3, disminuyendo su expresión de forma paulatina hasta el día +12. La ON se muestra de forma abundante durante todo el proceso, teniendo una expresión insignificante la BSP (121).

1.3.1.2.Diferenciación osteoblástica.

El proceso de diferenciación osteoblástica tiene lugar a través de una cascada de señales que da como resultado la generación de factores que favorecen el proceso de proliferación y expresión secuencial de genes relacionados con la biosíntesis, organización y mineralización de la matriz extracelular ósea. En la actualidad, se están produciendo avances encaminados a la identificación de factores esenciales en el crecimiento y diferenciación de los osteoblastos. El conocimiento concreto y más en profundidad de los mecanismos de progresión celular a osteoblasto es esencial para permitir una intervención racional sobre determinados problemas óseos, permitiendo abordar la estimulación de la formación de hueso en determinadas patologías relacionadas con el envejecimiento del tejido, el tratamiento de fracturas, las enfermedades metabólicas óseas, así como la estabilidad de los implantes cuyo uso es tan frecuente en traumatología y ortopedia (2).

La formación de tejido óseo ocurre desde la fase embrionaria. De esta forma, podemos ver como la esquelotogénesis se diferencia en dos procesos diferentes que se inician en la etapa embrionaria y continúan en la adulta. En primer lugar, la génesis de hueso intermembranoso del que están formados los huesos planos, se produce a través de la diferenciación de las células mesenquimales directamente a osteoblastos. Por otro lado, el reemplazo del hueso reabsorbido es un proceso producido por los osteoblastos provenientes de las células madre mesenquimales que se reclutan en la médula ósea. Para el caso de la formación de hueso endocondral, producida en los huesos largos, esta se

origina a través de la diferenciación de las células madre mesenquimales a línea cartilaginosa para, posteriormente pasar a cartílago calcificado que terminará por convertirse en hueso (122–124).

Osteoprogenitores

Los preosteoblastos podemos observarlos en una o dos capas de células que se sitúan detrás del osteoblasto y cerca de las superficies donde se forma el hueso. Estas células aparecen alargadas, fibroblásticas o con forma de huso, con núcleo ovalado y alargado y con alto contenido en glucógeno. Existen marcadores fenotípicos como la ALP, típicamente expresada por los osteoblastos, que pueden ser expresado por los preosteoblastos, aunque menos que en los osteoblastos maduros. A pesar de esto, el preosteoblasto aún no ha adquirido la mayor parte de las características diferenciadas de los osteoblastos maduros, como la existencia de un retículo endoplasmático rugoso y bien desarrollado (2).

Los osteoprogenitores, que son las que dan lugar al linaje osteoblástico son reconocidos en el hueso como un preosteoblasto. Dichas células osteoprogenitoras parecen tener una limitada capacidad de autorenovación en comparación con las células madre mesenquimales. Sin embargo, una de las características de los preosteoblastos es su capacidad para dividir y aumentar el tamaño del hueso. La proliferación y diferenciación del osteoprogenitor recibe influencia directa de muchos factores de crecimiento como TGF- β 1, BMP, FGF, factor de crecimiento endotelial (VEGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor 1 derivado de las células estromales (SDF-1); identificados como factores de la expansión de las MSCs o de las unidades formadoras de colonias fibroblásticas (CFU/F).

El factor inhibidor de la leucemia (LIF), mantiene tanto a las poblaciones de células madre como a los osteoprogenitores, a la vez que inhibe la diferenciación *in vitro*, aunque tiene una actividad osteogénica *in vivo* (125,126). Por otro lado, el FGF tiene efectos tanto negativos como positivos en la proliferación de los osteoprogenitores. Todos los factores de crecimiento expresados y producidos por los osteoblastos se almacenan en la matriz extracelular, proporcionando un mecanismo a nivel local para la estimulación de la proliferación de los osteoprogenitores (127,128).

En lo que se refiere al proceso de diferenciación de las MSCs y toda la serie de señales y moléculas que en ella intervienen, hay que destacar las proteínas relacionadas con la PTH que actúan aumentando la expresión del receptor BMP-1A y la capacidad de respuesta de BMP-2, que promueven la osteoblastogénesis pero inhiben la adipogénesis. El receptor huérfano de la tirosina quinasa promueve, de igual modo, la diferenciación de los osteoblastos con la inducción del OSX y la supresión de algunos factores adipogénicos (129).

Las fuerzas físicas son, de igual modo, un componente importante para la diferenciación de las MSCs a osteoblastos, ya que la microgravedad inhibe la formación de colonias de osteoblastos en las MSCs y aumenta la formación de adipocitos (130,131). Por último, los reguladores transcripcionales de la expresión génica tienen fuertes y directos efectos sobre la modificación de los fenotipos celulares (2).

Varios estudios han puesto de manifiesto los genes clave en la diferenciación a línea osteoblástica. De este modo, se sabe que la osteogénesis *in vivo* requiere de los genes Runx2 y OSX (110,132–135). Las MSCs actúan a través de una serie de pasos programados de forma oportuna mediante la expresión de genes específicos que están bajo el control de vías osteogénicas. Una de las principales proteínas que actúa en este proceso es la BMP, que junto con las vías Wnt son cruciales, sobre todo para los primeros

pasos de la diferenciación osteoblástica, promoviendo el compromiso de la diferenciación de las MSCs a osteoprogenitor o condroprogenitor. Sobre el papel de las proteínas Wnt en el proceso de diferenciación de osteoblastos, se ha destacado la importancia de Wnt5a y Wnt10b (136). Los factores de transcripción específicos de osteoblastos representados como criterios mínimos para que se produzca el inicio de la diferenciación son el Runx2, el Dlx5 y el OSX (71).

En este sentido, estudios con ratones privados de Runx2 pusieron de manifiesto la imposibilidad de diferenciación osteoblástica. Esto conduce a la falta de formación de tejido óseo y a la incapacidad para formar condrocitos, lo que lleva consigo un proceso de hipertrofia (71,133). De forma específica, el Runx2 regula positivamente determinados componentes esenciales en el hueso, como Col I, ALP y BSP; tanto en osteoblastos como en otras células como los fibroblastos, no pertenecientes a la línea ósea (112). Así, cuando este factor de transcripción se sobre expresa en MSCs de origen humano de tejido adiposo, se compromete la diferenciación de estas a osteoblastos, al aumentar la actividad de la ALP y OSC (137). Este factor se muestra esencial en los procesos iniciales de la diferenciación de los osteoblastos. Sin embargo, no parece esencial para la expresión de los genes que se encargan de la codificación de proteínas de la matriz ósea en los osteoblastos maduros (71).

Una vez que se ha establecido el grupo de osteoprogenitores que expresan Runx2 y Col I, se sucede una fase de proliferación en la que estos adquieren actividad ALP. En este momento es cuando se forman los preosteoblastos, que aumentan de tamaño, adquieren forma cuboide, tienen una alta actividad ALP y son muy activos en la secreción de proteínas de la matriz ósea (71).

Como se ha puesto de manifiesto, otro de los factores básicos en el proceso de diferenciación de los osteoblastos es el OSX, cuya expresión en MSCs se ve estimulada

por las BMP y el IGF-1 (138). Se ha demostrado que el condicionamiento del OSX en la diferenciación no es tan crucial como en el caso del Runx2, y su activación está inducida por BMP-2, siguiendo tanto las vías dependientes del Runx2 como las independientes (139,140). La BMP-2 se expresa de forma especial en las áreas que rodean la condensación de cartílago, adquiriendo un papel destacado en la proliferación y maduración de condrocitos, mejorando la osificación endocondral (70). Así, los ratones que no expresan BMP-2 son más propensos al desarrollo de fracturas de forma espontánea (141). Por su parte, el defecto de BMP-2 y BMP-4 en ratones produce un deterioro importante de la osteogénesis. En lo que respecta al BMP-7, este conduce a un aumento de la actividad ALP en osteoblastos y desencadena el proceso de mineralización (142).

En lo que se refiere al FGF y su participación en el proceso de osteoblastogénesis, se ha puesto de manifiesto como ratones con un defecto en FGF-2, presentan una disminución del proceso de formación ósea y, por tanto de la masa ósea; además de un aumento del número de adipocitos en la médula ósea (115). A pesar de que el FGF aumenta la proliferación de los preosteoblastos, lo que retrasaría el proceso de diferenciación, existen trabajos que demuestran su efecto anabólico a través del aumento del conjunto de células osteoprogenitoras. Así, el FGF-18 regula de forma positiva la diferenciación de osteoblastos a través de un mecanismo autocrino (143).

Por otro lado, existen una serie de factores de transcripción que inhiben la adipogénesis, como el ácido retinoico, y aumentan el conjunto de progenitores que darán lugar a la línea osteogénica (144). La potencia del Runx2 para dirigir el compromiso osteogénico en la embriogénesis temprana se basa en su capacidad para activar genes fenotípicos óseos en células pluripotentes y redirigirlos al linaje osteoblástico e inhibir el fenotipo adipogénico (144,145). Con respecto al OSX, se sabe que este funciona para impulsar las células que expresan Runx2 aún más a linaje osteogénico (6).

Osteoblastos maduros

Cuando nos referimos a la diferenciación de estas células, muchos de los estudios se basan en la identificación de las mismas por mecanismos morfológicos e histológicos. Normalmente, en el periostio o en la médula ósea se identifica un gradiente de diferenciación que se observa a medida que la célula osteoprogenitora alcanza la superficie del hueso y el fenotipo del osteoblasto se expresa de forma completa. Para el proceso de diferenciación y maduración de los osteoblastos, la comunicación intercelular es de suma importancia (2).

La mineralización lleva a la diferenciación osteoblástica a la etapa final, ya que cuando el osteoblasto formador de hueso queda encerrado en su propia matriz mineralizada, es un osteocito. Sobre la superficie ósea inactiva, el osteoblasto se aplanar a una célula de revestimiento y forma el endostio (146).

En el momento en el que el preosteoblasto deja de proliferar, se desencadena un evento de señalización que es clave para el desarrollo del osteoblasto maduro a través del osteoprogenitor. En este sentido, en la etapa madura el osteoblasto presenta todas las funciones que se requieren para caracterizar al hueso (2).

Como sabemos, la función principal del osteoblasto maduro en la superficie ósea es la producción de matriz mineralizada. De este modo, un alto nivel de ALP inespecífica junto con la capacidad de síntesis de varias proteínas no colágenas que se encuentran en abundancia en estas zonas, le da esa propiedad al osteoblasto. Sobre la ALP, es un marcador muy aceptado en la formación de hueso nuevo, así como en la actividad temprana de los osteoblastos. Por otro lado, este marcador tiene expresión mucho más baja o prácticamente nula en osteocitos y osteoprogenitores (2).

Existen una serie de factores de transcripción que aparecen durante la diferenciación de los osteoblastos. Así, la expresión del gen de la OSC específica del hueso ha proporcionado un punto de partida para la definición de la expresión de genes restringidos exclusivamente a osteoblastos. Por otro lado, también hemos visto como el Runx2 y el OSX tiene una función importante en el inicio y desarrollo de la diferenciación (2).

En la etapa tardía de la diferenciación, el osteoblasto presenta una mayor expresión de determinadas proteínas de la matriz ósea, como la OSC, la BSP I y II y el Col I. En este momento es cuando el osteoblasto se encuentra en la etapa adulta – madura, y queda atrapado de forma eventual en la matriz recién formada y mineralizada (71).

Este es el momento en el que los osteoblastos maduros pueden sufrir tres tipos de procesos: apoptosis, paso a osteocitos o conversión a células de revestimiento óseo. Estas últimas son células quiescentes con forma aplanada que cubren la superficie ósea y representan la fase de reposo en el proceso de mineralización. Una de las posibles funciones de esta tipo de célula puede ser la prevención de la interacción directa entre osteoclastos y matriz ósea en los momentos en los que no es necesario el proceso de reabsorción de tejido óseo (147).

La actividad anabólica de los osteoblastos está regulada en gran medida por los factores de crecimiento que se encargan de la estimulación en la producción de osteoprogenitores y hormonas que promueven el proceso de diferenciación. El IGF tiene un papel significativo en el control de la formación ósea, mediando en la expresión de OSX y Runx2. Tanto el IGF-1 como el IGF-2 se expresan altamente en los osteoblastos y estimulan la proliferación celular y la síntesis de colágeno. Diferentes estudios han relacionado el IGF tanto con la producción como con el recambio óseo. Como se ha visto, generalmente los factores de crecimiento y las hormonas esteroideas tienen un papel

principal sobre los osteoblastos inmaduros y pueden modificar de forma radical el proceso de diferenciación cuando son añadidos *in vitro* a las células del linaje osteoblástico en proliferación (148–157).

Hormonas esteroideas como los glucocorticoides, además de los esteroides, tienen un efecto selectivo sobre el proceso de diferenciación de los osteoblastos. Estas moléculas actúan promoviendo la diferenciación en etapas poco maduras del osteoblasto e inhibiendo la capacidad anabólica de los mismos y promoviendo, al mismo tiempo, la capacidad resorptiva del osteoblasto en etapas de maduración tardía. En general, como se ha mencionado anteriormente, los factores de crecimiento y las hormonas esteroideas tienen un papel muy importante en el osteoblasto no maduro, a la vez que pueden modificar de forma acentuada el proceso de diferenciación cuando se añaden a osteoblastos en fase de proliferación (158–160).

Osteocitos

La evolución del osteoblasto en la matriz activa mineralizada supone un maduración del mismo mediante el encierro en la matriz y la diferenciación de estos más activamente a osteocitos, células que suponen entre un 90 – 95% del total del tejido óseo (161,162). Por otro lado, estas son también las células más longevas del hueso, pudiendo tener una vida útil de hasta 25 años (163).

La identificación de los osteocitos es fácil cuando se realiza en una sección ósea, ya que están completamente integrados en la matriz. De esta forma, la identificación principal de los mismos se basa en sus características morfológicas. Clásicamente, la definición de las funciones del osteocito estaba dificultada por el problema encontrado para aislarlos de la matriz. Recientemente, mediante el desarrollo de nuevas técnicas, se

ha hecho posible el estudio de los mismos poniendo de manifiesto que se trata de un grupo celular con funciones determinantes sobre el tejido óseo (70,164).

Los osteocitos son células con forma arácnida de origen mesenquimal que se encuentran inmersas en la matriz ósea. Cada célula posee hasta 50 ramificaciones largas que forman una red de canalículos interconectados a lo largo de todo el hueso. Estas células mantienen contacto entre sí y, muy probablemente, con otros grupos celulares mediante uniones que permiten el transporte intercelular de diferentes moléculas que actúan a modo de señal, como las prostaglandinas y el óxido nítrico. Esta comunicación intercelular también se hace posible a través del fluido intersticial a través de los canalículos de los osteocitos. Se trata de una red básica para el tejido óseo que coordina la respuesta del hueso a señales de tipo mecánico y biológico (165–167).

Existen cuatro etapas reconocibles de la diferenciación del osteocito: osteocito – osteoblasto (preosteocito Tipo I), osteoide – osteocito (preosteocito Tipo II), preosteocito Tipo III, osteocito no maduro y osteocito maduro (168).

Durante el proceso de formación del hueso, una subpoblación de osteoblastos comienza a diferenciarse para convertirse en osteocitos funcionales. El trascurso de la diferenciación está determinado por cambios importantes a nivel morfológico y ultraestructural. Mediante estos cambios el osteoblasto con forma redondeada va cambiando y pasando por las diferentes etapas por las que pasa la diferenciación a osteocito, hasta que se convierte en osteocito maduro y se integra en el osteoide. Los osteocitos Tipo I y II son de mayor tamaño que los osteocitos maduros y tienen un gran aparato de Golgi para la síntesis de colágeno. Cuando se produce la mineralización del osteoide, el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático disminuyen de tamaño, correspondiendo con la disminución en la síntesis y secreción de proteínas. Esta etapa final de diferenciación del osteocito se podría dividir en otras dos etapas, aquella en la

que la matriz del osteocito no está completamente mineralizada (preosteocito Tipo III); y la otra en la que la matriz está mineralizada y se forma el osteocito maduro (71).

En este punto, la mayoría de los marcadores expresados previamente por los osteoblastos (OC, BSPII, Col I y ALP), o bien no se expresan o se expresan mínimamente. Mientras tanto, los marcadores específicos de los osteocitos, como la proteína de matriz de dentina I (DMPI) y la esclerostina (Sost) están expresados de manera acentuada. El periodo aproximado en el que el osteoblasto se diferencia a osteocito es de unos 3 días, sintetizando durante este periodo una cantidad de matriz superior a 3 veces su volumen (71).

1.3.2. Células de revestimiento óseo.

Se trata de osteoblastos quiescentes con forma plana que se sitúan cubriendo las superficies óseas donde no existe de forma activa ningún proceso de formación o reabsorción ósea. Presentan núcleos delgados y planos, con un citoplasma que se extiende a lo largo de la superficie del hueso. Tienen pocos orgánulos en el citoplasma, con aparato de Golgi y retículo endoplasmático rugosos. Algunas de estas células muestran conexiones entre ellas y con los osteocitos a través de los canaliculos (7).

La capacidad y actividad secretora de este grupo de células está relacionada con el estado fisiológico del hueso, destacando como estas pueden volver a adquirir su actividad secretora haciendo modificaciones en su tamaño y adquiriendo una apariencia cuboide.

En lo que se refiere a las funciones de este grupo de células, estas no son conocidas al completo, aunque se ha destacado su papel en la evasión de la interacción directa entre los osteoclastos y la matriz ósea, en los momentos en los que no es necesaria la

reabsorción ósea. Por otro lado, también participan en la diferenciación de los osteoclastos mediante la producción de OPG y del activador del receptor del factor nuclear ligando kappa-B (RANKL). Por otra parte, estas células de forma conjunta con otras, son un componente importante de las unidades celulares básicas del tejido óseo, una estructura anatómica presente durante el proceso de remodelación ósea (169–172).

1.3.3. Osteoclastos

Los osteoclastos son células multinucleadas originadas a partir de células mononucleares del linaje de células madre hematopoyéticas a través de la influencia de determinados factores. Entre los mismos, se destacan el factor de estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), secretado por las células osteoprogenitoras y por los osteoblastos. Otro de los factores influyentes en el origen de esta línea celular es el RANKL, que es secretado por osteoblastos, osteocitos, células de revestimiento óseo y las células estromales. Estos y otros desencadenan la activación de los factores de transcripción y la expresión génica de los osteoclastos (173–177). Por otro lado, la OPG se une al RANKL, evitando de este modo la interacción RANK y RANKL e inhibiendo la osteoclastogénesis. De este modo, los mediadores RANKL/RANK/OPG son un sistema crucial en la formación de osteoclastos (178–182).

Estudios recientes han puesto de manifiesto que el carácter osteoclastogénico puede ser diferente dependiendo del lugar óseo considerado. Así, se ha visto como en la médula ósea de los huesos largos, la formación de los osteoclastos es más rápida que en el caso de la mandíbula. Esto podría ser debido a la diferente composición medular en diferentes zonas óseas (183).

La función clave del osteoclasto es acidificar el sustrato del tejido óseo donde se localiza, disolviendo el mineral óseo. El osteoclasto es una célula esencial, tanto en la formación del esqueleto como para el uso del tejido óseo en el mantenimiento del calcio, como forma de regulación del exceso de ácido en el sistema circulatorio (2).

Por otro lado, el osteoclasto presenta otras funciones, algunas de ellas se cree que están aún por dilucidar. Así, se ha puesto de manifiesto como estas células producen factores conocidos como clastocinas, cuya misión es el control de los osteoblastos durante el ciclo de remodelación ósea. Recientemente se ha puesto de manifiesto como los osteoclastos pueden regular de forma directa el ciclo de las células madre hematopoyéticas. Todo esto pone de manifiesto como el osteoclasto no es solo una célula encargada del proceso de reabsorción ósea, sino que son también capaces de generar una serie de citoquinas con capacidad de influir en otros grupos celulares (184).

El aumento anormal en la formación y en la actividad de los osteoclastos conlleva al desarrollo de algunas enfermedades óseas como la osteoporosis, proceso en el que la reabsorción de hueso es superior a la formación, causando una disminución de la densidad ósea, con el consiguiente aumento en el riesgo de desarrollo de fracturas. Por otro lado, en otras afecciones patológicas relacionadas con el tejido óseo como las metástasis óseas o la artritis inflamatoria, la activación anormal de los osteoclastos conlleva a la formación de lesiones periarticulares y osteolíticas (175,185,186). Otro ejemplo representativo del papel de los osteoclastos en determinadas patologías óseas es la periodontitis, producida por la migración de las células inflamatorias que genera la colonización bacteriana. Las células inflamatorias producen entre otros, IL-6 y RANKL, con lo que se estimula la migración de los osteoblastos. De este modo, se produce una anormal reabsorción ósea localizada en el hueso alveolar, que desencadena pérdida de piezas dentales y lleva a la progresión de la periodontitis (182,187–191). La osteopetrosis es otro de los ejemplos de

patología relacionada con los osteoclastos, en la que las mutaciones genéticas producidas en los osteoclastos conducen a una disminución de la reabsorción ósea, lo que conlleva a una acumulación excesiva de masa ósea (192).

1.4. Remodelado óseo

El remodelado óseo es un proceso dinámico en el que participan de forma coordinada y sincrónica osteoblastos y osteoclastos, constituyendo lo que se conoce como unidad multicelular básica. Estas unidades, asociadas a una serie de vasos sanguíneos e inervación periférica, son los elementos que determinan el proceso de remodelado (193,194).

Las diferentes fases por las que pasa el proceso son: fase resortiva, fase reversa y fase formativa (195).

La fase resortiva se inicia por la estimulación de la PTH, que promueve el desplazamiento de preosteoclastos a la superficie de tejido óseo a ser degradada. En la degradación participan factores como el RANKL, M-CSF, que tienen una influencia osteoclastogénica, y el factor quimiotáctico de monocitos (MCP-1). Las células osteoclasticas, mediante procesos de acidificación y proteólisis de la matriz y los cristales de hidroxapatita, inician el proceso de remodelado (196–199).

En la fase reversa, la presencia de células mononucleares conocidas como células del endostio prepara la superficie del hueso para la estimulación de la migración y diferenciación de los osteoblastos (171).

La fase formativa o de síntesis de matriz ósea ocurre en dos etapas principales: el depósito de la matriz orgánica y el consecuente proceso de mineralización, con las fases vesicular y fibrilar (2).

Para el depósito de la matriz orgánica, los osteoblastos sintetizan y segregan proteínas colágenas, sobre todo Col I; así como proteínas no colágenas como OSC, OPN, ON y BSP II. Por otro lado, y como parte del proceso de depósito de la matriz ósea, también se encargan del aporte de proteoglicanos como la decorina y el biglicano.

En el proceso de mineralización, la fase vesicular es la que ocurre cuando son liberadas en fracciones llamadas vesículas de matriz, de la membrana apical de los osteoblastos a la matriz ósea recién formada. Estas vesículas se unen a los proteoglicanos y otros componentes orgánicos. La carga negativa de los proteoglicanos sulfatados, produce la inmovilización de los iones de calcio que se encuentran en el interior de las vesículas de la matriz. En el momento en el que los osteoblastos segregan una serie de enzimas que digieren a los proteoglicanos, los iones de calcio se liberan del interior de estos y atraviesan los canales de calcio de la membrana de las vesículas de la matriz. Los canales de calcio están formados por unas proteínas conocidas como anexinas (119,200,201). Por su parte, la ALP segregada por los osteoblastos degrada los compuestos que contienen fosfato, lo que produce la liberación de iones fosfato dentro de las vesículas de la matriz. Posteriormente, se produce la unión de los iones fosfato y calcio en el interior de las vesículas nucleadas, lo que da como resultado la formación de los cristales de hidroxapatita (7).

En la fase fibrilar del proceso de mineralización, se produce una sobresaturación de los iones de calcio y fosfato en el interior de las vesículas, resultando en la ruptura de estas estructuras y permitiendo la extensión de los cristales de hidroxapatita en la matriz circundante (202,203).

1.5. Endocrinología ósea.

Como se ha puesto de manifiesto en numerosos estudios, el tejido óseo puede influir de forma directa o indirecta en la regulación y secreción de determinadas moléculas de carácter hormonal. Del mismo modo, este tejido también está claramente influenciado por hormonas del sistema endocrino.

Una de las hormonas que mayor influencia tiene en el metabolismo óseo y homeostasis mineral es la PTH. Esta hormona, y sus proteínas relacionadas están directamente implicadas en numerosos parámetros óseos. La principal función de la hormona es la regulación de la homeostasis del calcio plasmático. En el momento en el que existe déficit de calcio a nivel metabólico, la PTH mantiene los niveles de calcio en plasma movilizándolo el reservorio de calcio presente en el hueso en forma de cristales de hidroxiapatita. La acción de la hormona sobre el hueso produce un aumento de la reabsorción ósea por parte de los osteoclastos y, como consecuencia, un aumento del flujo de calcio a nivel metabólico (2).

Por su parte, está presente el 1- α ,25 hidroxicolcalciferol, forma activa de vitamina D que es producida en el riñón e hidroxilada en el hígado; siendo considerada una hormona. Los receptores de la vitamina D son los que permiten el correcto uso y asimilación de la misma. Las funciones de esta hormona son mejorar el calcio y la reabsorción de fosfato desde el intestino, con la finalidad de mantener concentraciones normales a nivel circulatorio, y proveer adecuadas cantidades de estos dos minerales a los lugares donde existe formación y remodelación ósea, permitiendo una adecuada mineralización (204–206).

Otras hormonas relacionadas con el tejido óseo son los estrógenos, formando parte importante del desarrollo esquelético y homeostasis del mismo. Un ejemplo significativo del efecto de estas hormonas sobre el hueso es el aumento drástico de la pérdida de tejido

tras la menopausia. Por este motivo, los estrógenos son la primera línea de tratamiento en la osteoporosis postmenopausica. Esto se debe a que las hormonas esteroideas suprimen la reabsorción ósea, además de aliviar los síntomas adicionales de la patología (207–210).

Los andrógenos son otras hormonas consideradas a la hora de estudiar las características endocrinológicas presentadas a nivel tisular por el hueso. Así, estas hormonas presentan variadas funciones en este tejido, regulando los procesos de proliferación, diferenciación, apoptosis, acumulación mineral y producción de matriz ósea (2).

Finalmente, la hormona tiroidea es otra de las moléculas con un papel importante en el tejido óseo. En el esqueleto en desarrollo, la hormona tiroidea es necesaria para el reclutamiento y maduración de las células de cartílago y hueso. Una producción deficiente de la hormona en el útero y durante la etapa neonatal supone un retraso en el crecimiento y en la maduración esquelética. El papel de la hormona en el adulto está relacionado con el aumento de la remodelación ósea. Cuando existe un exceso de hormona se produce una alteración del metabolismo del calcio y puede llevar a una pérdida de la masa ósea (211–213).

1.6. Inmunología ósea.

Sobre el papel de las células del tejido óseo a nivel inmunológico se han venido realizando en los últimos años numerosos trabajos en los que se estudia una de las funciones que, a nivel inmunológico presenta el hueso: la fagocitosis (88,108).

De esta forma, existen células pertenecientes al sistema inmune innato que detectan rápidamente cualquier lesión que se pueda producir en el tejido óseo. Este tipo de macrófagos son denominados macrófagos óseos, ya que se encuentran localizados

inmediatamente adyacentes a los osteoblastos y se encargan de regular la formación ósea y participar en la homeostasis a nivel esquelético (214,215).

Por otro lado, los macrófagos óseos participan de forma activa en la primera fase de la reparación ósea en el caso de las fracturas. Se sabe que, en la fase inflamatoria del proceso inicial de respuesta, los macrófagos óseos inician la cascada inicial de eventos que se produce en la mayor parte de tejidos tras ser dañados, culminando en la inducción del hematoma vascularizado que dará lugar al tejido que conocemos como tejido de granulación. Este es el comienzo del proceso anabólico que se produce durante la reparación de tejidos dañados (216–218).

Además, se ha visto como este tipo de macrófagos adyacentes a los osteoblastos son capaces de fagocitar cuerpos celulares que han sufrido procesos de apoptosis o necrosis, como osteoblastos y osteoclastos (219,220).

Otra de las importantes funciones que se han puesto de manifiesto sobre los macrófagos óseos es la capacidad de participar en el control de las metástasis óseas de tumores como el de mama y próstata, siendo capaces de reclutar células en la zona a la que empiezan a llegar las células cancerosas primarias (221–223).

De otra parte, la similitud en el perfil antigénico de los osteoblastos con otras líneas celulares que presentan funciones inmunológicas fue descrito por nuestro grupo de investigación (85,86,93). En este sentido, también pusieron de manifiesto la capacidad fagocítica de los osteoblastos humanos en cultivo, así como a las células osteoblásticas de la línea MG63 frente a determinadas partículas sintéticas (látex) y microorganismos (*E. Coli*, *Klebsiella* y *C. Albicans*) (88,108). Además, mediante estudios *in vitro* los osteoblastos humanos muestran capacidad para actuar como células presentadoras de antígeno al estimular alogénicamente los linfocitos T (108). De igual modo, otros grupos

de investigación han puesto de manifiesto como osteoblastos en cultivo son capaces de generar una respuesta ante la presencia de *S. aureus* o *Salmonella* mediante la secreción de citoquinas inflamatorias, factores estimuladores de colonias y quimiocinas. Todos estos factores actúan como mediadores inmunitarios que, siendo secretados por los osteoblastos, pueden jugar un papel importante en el reclutamiento de macrófagos, neutrófilos y linfocitos T; produciendo la respuesta inflamatoria necesaria en los sitios de infección (224–227). Además, se ha demostrado como los osteoblastos son capaces de expresar el marcador de superficie CD40 en presencia de *S. aureus* o *Samonella*, lo que supone una conexión con lo descrito anteriormente sobre la capacidad de esta línea celular para actuar como células presentadoras de antígenos, mediando en la estimulación de los linfocitos T (228). Dentro de la capacidad funcional inmunológica del osteoblasto también está la presencia intracitoplasmática de determinadas citoquinas con funciones de tipo inmunológico. Se ha demostrado la presencia de IL-4, IL-12, IL-15 e IL-18, además de IFN γ , moléculas con funciones importantes en los procesos que desencadenan respuestas inmunes; lo que sugiere que los osteoblastos son células con características y funciones inmunes (229).

2. *Antiinflamatorios no esteroideos*

2.1.El proceso inflamatorio

El proceso inflamatorio es una respuesta presentada por el organismo ante estímulos y afecciones nocivas, como infección o daño tisular (230,231). Se trata de la expresión principal del sistema inmune mediada por la capacidad de poner en marcha un mecanismo conocido como cascada inflamatoria (232).

De forma general, se piensa que la respuesta inflamatoria controlada es una respuesta orgánica beneficiosa, aunque se puede convertir en una respuesta perjudicial cuando se pone en marcha de una forma descontrolada, como ocurre por ejemplo en el shock anafiláctico. Para el caso de los procesos infecciosos, la justificación del proceso inflamatorio está clara, aunque muchos otros tipos de respuesta inflamatoria patológica no se conocen (233).

Con independencia de la causa, la inflamación se produce como una respuesta adaptativa para proceder a la restauración de la homeostasis. El nivel básico de la respuesta inflamatoria aguda desencadenada por la infección o la lesión tisular implica la participación de diferentes componentes sanguíneos (plasma y leucocitos) al sitio de infección o lesión. Esta etapa inicial está mediada por macrófagos y mastocitos presentes en los tejidos, lo que conduce a la liberación y actuación de una variedad de mediadores inflamatorios, como citoquinas, quimiocinas, aminas vasoactivas, eicosanoides y productos de la cascada proteolítica (230,231,234).

La respuesta inflamatoria aguda tiene como objetivo la eliminación del agente externo causal de la agresión seguido de una fase de resolución y reparación, siendo mediado principalmente por los macrófagos reclutados y residentes en los tejidos. En caso que la respuesta inflamatoria aguda no consiga eliminar el agente externo, el proceso inflamatorio persiste y adquiere nuevas características. El infiltrado inicial con neutrófilos se reemplaza con macrófagos, y posteriormente actúan los linfocitos T. En el caso de que el efecto combinado de estas células siga siendo insuficiente, se produce un estado inflamatorio crónico que implica la formación de granulomas y tejidos linfoides terciarios. Las características de este estado inflamatorio difieren dependiendo del tipo de células T efectora presente (231,235).

Además de la presencia de los agentes causantes del proceso inflamatorio, la inflamación crónica puede resultar en un daño tisular, como ocurre en el caso de las respuestas autoinmunes o la presencia de cuerpos extraños no degradables. Los intentos fallidos de los macrófagos de fagocitar los agentes extraños pueden dar lugar a la formación de granulomas en los que se acantonan los agentes envueltos por macrófagos en un intento de proteger al huésped (230,231).

2.1. Antiinflamatorios no esteroideos

Los (AINEs), son un grupo de medicamentos muy utilizados a nivel mundial. De forma general se usan para tratar procesos febriles, el dolor y la inflamación. Estos fármacos forman parte de un grupo heterogéneo de compuestos que frecuentemente no se encuentran relacionados químicamente, pero que si comparten ciertas acciones de tipo terapéutico y efectos secundarios/adversos. La aplicación de uno u otro antiinflamatorio va a depender fundamentalmente del fin terapéutico que se persiga, aunque también es cierto que en muchos casos pueden tenerse presentes los efectos secundarios/adversos a los que se enfrentan los pacientes con el uso (236). Los AINEs más utilizados a nivel mundial son el diclofenaco y el ibuprofeno (236).

El mecanismo de acción por la que se producen los efectos de estos fármacos es mediante la inhibición de la enzima ciclooxigenasa (COX). A causa de la inhibición de la COX se inhiben las rutas que sintetizan ciertas prostaglandinas (PGs) y tromboxanos (TXs). Hay dos isoenzimas principales de la COX, la COX-1 y a COX-2. Los AINEs inicialmente descritos actúan inhibiendo ambas isoenzimas. Debido a los efectos secundarios/adversos que producen los AINEs, posteriormente se han diseñado AINEs que actúan de forma selectiva inhibiendo solo a la COX-2, lo que produce menos daño a nivel gastrointestinal e igual efecto terapéutico (237).

2.2. Tipos

Los AINEs son comúnmente clasificados atendiendo a sus propiedades químicas y farmacológicas, así como a su selectividad en lo que se refiere a la inhibición de la COX.

En base a la estructura química de los mismos, Antman et al (238), propusieron la siguiente clasificación:

- Salicilatos y sus derivados: ácido acetil salicílico (aspirina®), sulfosalazina.
- Derivados del paraaminofenol: acetaminofén (paracetamol®). Considerado como AINE aunque su acción antiinflamatoria es muy reducida.
- Ácido indoleacético e indeneacético: indometacina, etodolaco, sulindaco.
- Ácidos hetero arilacéticos: diclofenaco, ketorolaco, tolmetina.
- Ácidos arilpropionicos: ibuprofeno, ketoprofeno, flurbiprofeno, naproxeno, fenoprofeno, aceclofenaco oxaprozina, fenclofenaco.
- Ácidos antranílicos: ácido mefenámico, ácido meclofenámico.
- Ácidos enólicos: piroxicam, meloxicam, tenoxicam.
- Alkanos: nabumetone.
- Pirazolidindionas: fenilbutazona, oxifenilbutazona.
- Diaril – heterocíclicos (inhibidores selectivos de la COX-2): celecoxib, rofecoxib, valdecoxib, lumiracoxib, parecoxib, etorocoxib.

Este tipo de medicamentos son químicamente similares, pero pueden tener diferencias en lo que se refiere a las propiedades farmacocinéticas. La mayor parte presenta absorción completa, metabolismo hepático de primer paso insignificante, estrecha unión a las proteínas séricas y pequeños volúmenes de distribución. Experimentan diversas transformaciones a nivel hepático a través de los citocromos

CYP3A y CYP2C. La vida media varía entre los que se consideran de acción corta, con una acción de menos de 6 horas; y acción prolongada, con más de 6 horas (239).

La afinidad de uno u otro inhibidor de la COX determina su relativa selectividad. De este modo, podemos proceder a la clasificación de los mismo en base a esta característica (236):

- AINEs con capacidad selectiva pobre que inhiben completamente COX-1 y COX-2: ibuprofeno, diclofenaco, ácido acetil salicílico, piroxicam, naproxeno.
- AINEs capaces de inhibir COX-1 y COX-2 con selectividad preferente por la COX-2: celecoxib, meloxicam, etodolaco.
- AINEs con alta capacidad de inhibición de COX-2 y pobre para el caso de COX-1: rofecoxib, NS-398.
- AINEs que parecen tener baja inhibición sobre ambas COX: salicilato sódico, nabumetone.

2.3.Mecanismo farmacológico de acción

A pesar de la diversidad estructural presente en los diferentes AINEs, todos son capaces de inhibir la COX (240). Las PGs son los productos finales del metabolismo de los ácidos grasos, generados a través de la vía COX. Su actividad metabólica está relacionada con su papel como mediadores fisiológicos y patológicos en diversidad de procesos, como la inflamación, el dolor, la fiebre, el cáncer y enfermedades neurológicas. Por su parte, el ácido araquidónico (AA), es un ácido graso de carbono presente en las membranas celulares y precursor de la síntesis de PGs. El AA es liberado debido a una gran variedad de estímulos, convirtiéndose posteriormente a través de la COX y la enzima

lipooxigenasa, en mediadores lipídicos conocidos como eicosanoides. A través de la vía COX, las dos isoformas de COX (COX-1 y COX-2) catalizan el primer paso para la biosíntesis de PGs y TXs (241,242).

La COX-1 se expresa en la mayor parte de los tejidos, y los prostanoides que se producen a través de esta isoforma normalmente participan como mediadores en funciones de limpieza, regulación del flujo renal y agregación plaquetaria. A través de esta isoforma también se induce la diferenciación celular y la angiogénesis. La COX-1 es la única forma expresada por las plaquetas (243–245).

En cuanto a la COX-2, es una enzima altamente inducible y expresada de forma constitutiva en tejidos como el cerebro, la médula espinal y los riñones. La expresión de este enzima está muy restringida en condiciones basales, aunque aumenta de forma considerable en los sitios en los que existe un proceso inflamatorio en respuesta a citoquinas como el interferón, TNF, IL1, hormonas, factores de crecimiento e hipoxia. También se ha observado su expresión en células neoplásicas y endoteliales en diferentes tumores (246–255).

Se ha puesto de manifiesto la presencia de una tercera forma de COX. La COX-3 es una variante de la COX-1 con poca probabilidad de actividad productora de PGs en tejidos humanos. En estudios con ratas se ha visto como la COX-3 es expresada, aunque sin actividad COX (256,257).

Sobre los efectos a nivel farmacológico de los AINEs, estos se deben al bloqueo de la COX y, como consecuencia, la reducción de la síntesis de PGs, lo que deriva en una disminución de la inflamación, el dolor y la fiebre. La reducción del proceso inflamatorio se debe a la disminución de las PGs vasodilatadoras (PGE2 y PGI2), que de forma indirecta reduce el edema. Hay evidencia de que ambos tipos de PGs median en la

respuesta nociceptiva periférica y central. Por su parte, la fiebre es causada por altos niveles de PGE2, lo que altera la velocidad de disparo de las neuronas hipotalámicas que controlan la termorregulación, por lo que el efecto antipirético de los AINEs se debe a la inhibición de la PGE2 (240).

2.4.Efectos adversos

La inhibición de las PGs lleva aparejada una amplia gama de efectos adversos, donde se incluyen aquellos gastrointestinales, cardiovasculares, toxicidad renal, exacerbación de la hipertensión y retención de líquidos (258).

Los AINEs de tipo no selectivo conllevan a una mayor incidencia de efectos adversos, ya que no solo inhiben la COX-2, sino que también inhiben la COX-1, del que se piensa que está involucrado en el mantenimiento de la integridad de la mucosa gastrointestinal. La inhibición del mismo es la causa principal de una mayor incidencia de úlcera gastrointestinal. El desarrollo de los inhibidores selectivos de la COX-2 supuso la oportunidad de conseguir la misma eficacia sin la toxicidad gastrointestinal asociada a la inhibición de la COX-1 (259–261).

Con posterioridad al lanzamiento de los inhibidores selectivos de la COX-2 (celecoxib y rofecoxib), se puso de manifiesto el riesgo existente a nivel cardiovascular. El argumento está basado en que PGI2 es un vasodilatador y un potente inhibidor de la agregación plaquetaria causada por la COX-2 en los sitios de inflamación. De forma adicional, existen indicaciones de que la PGE2 y la PGI1, derivadas de la COX-2, protegen contra el daño oxidativo. Por lo tanto, tanto las PGs derivadas de la COX-1 y la COX-2 parecen desempeñar un papel importante en la regulación de la homeostasis vascular. El mayor riesgo de eventos cardiovasculares está probablemente relacionado

con múltiples mecanismos, incluida la función endotelial y la producción de óxido nítrico, daño oxidativo, presión arterial, retención de volumen y otros efectos renales (262–266).

Los AINEs también están relacionados con toxicidad renal. La inhibición de las isoformas de COX, conducen con frecuencia al desequilibrio transitorio de los niveles de electrolitos y agua. Las PGs producidas por la COX-1 afectan la homeostasis renal y aumentan la perfusión de este órgano; mientras que las producidas por la COX-2 tienen efectos diuréticos y natriuréticos (236,267). Teniendo en cuenta que la COX-2 normalmente se encuentra en el riñón, se ha planteado si los inhibidores selectivos de la COX-2 proporcionan una ventaja sobre la seguridad renal en AINEs. Se ha demostrado que la retención de sodio inducida por AINEs en personas sanas y de edad avanzada está mediada por la inhibición de la COX-2; mientras que la disminución de la tasa de filtración glomerular se asocia con la inhibición de la COX-1 (268).

Por otra parte, existe un riesgo de toxicidad hepática asociada a estos fármacos. El uso generalizado de los mismos está relacionado con un 10% de todos los casos existentes de toxicidad hepática inducida por fármacos (269)´.

Finalmente, en los últimos años se han reportado efectos adversos de los AINEs sobre el tejido óseo, en concreto sobre los osteoblastos; punto que se desarrollará en el siguiente apartado.

2.5. Aines y hueso

Los AINEs son un grupo de medicamentos con propiedades útiles para el tratamiento de patologías óseas (270,271), aunque numerosos estudios han puesto de manifiesto como algunos AINEs pueden alterar el crecimiento óseo, la remodelación e incluso la reparación. Sin embargo, estos efectos adversos se conocen poco y

normalmente no se toman en cuenta a la hora de prescribir estos fármacos para el tratamiento de enfermedades óseas. Numerosos grupos de investigación han abordado los diferentes efectos de estos medicamentos en el tejido óseo y han explorado su mecanismo de acción (272–274).

Los primeros estudios sobre el efecto adverso de los AINEs en el tejido óseo se enfocaron en sus repercusiones sobre la síntesis de PGs y la inhibición de la COX. Entre las acciones atribuidas a las PGs, se encuentra la regulación del metabolismo esquelético y la modulación de la proliferación y diferenciación de osteoblastos. Estas células son objetivo de estos reguladores metabólicos a la vez que son capaces de sintetizar los mismos, lo que explica porque la síntesis de PGs es un proceso autoregulatorio (275).

En lo que se refiere a la COX-1 y los osteoblastos, esta enzima es constitutiva de los mismos, siendo expresada en condiciones normales en el tejido óseo y en las zonas de fractura. Por su parte, la COX-2 es una enzima inducible, dado que no se detecta o se detecta en concentraciones muy bajas en osteoblastos no sometidos a estimulación. Sin embargo, la expresión o síntesis de la misma aumenta en situaciones como las etapas iniciales de la reparación ósea, procesos inflamatorios y cáncer (274,276–278).

En referencia a la producción de PGs, se encuentra regulada por fuerzas mecánicas, hormonas, citoquinas y factores de crecimiento. Esta producción parece estar controlada por los efectos inducibles de la COX-2, jugando la COX-1 un papel importante en la respuesta inicial después de la liberación del AA (279).

Algunos autores han sugerido que los AINEs inhiben la reparación ósea bloqueando la síntesis de PGs, en especial la PGE1 y la PGE2, a través del complejo COX. De esta forma, varios ensayos en animales han demostrado como el ketorolaco inhibe la reparación y remodelación ósea y reduce la proliferación celular. Este efecto

sobre el tejido óseo tiene lugar en las primeras etapas tras una fractura. De igual forma, se ha puesto de manifiesto el mayor riesgo de fracturas y como estos fármacos reducen el crecimiento óseo alrededor de los implantes ortopédicos y reducen la formación del callo óseo en pacientes con fracturas (272,280–283).

Otros estudios sugieren que la deficiencia o la inhibición de COX-2 producida por los AINEs dificulta la cicatrización en las fracturas óseas de forma más acentuada en las primeras etapas del proceso (280). La magnitud del efecto está relacionada con la duración del tratamiento (284). Por otro lado, se ha puesto de manifiesto como la COX-2 puede tener un papel importante en la diferenciación de las células madre mesenquimales, lo que puede tener efecto sobre las primeras etapas de la reparación ósea (285,286). Algunos autores proporcionan nuevas ideas, mostrando como la COX-2 se expresa constitutivamente en osteoblastos en las zonas de crecimiento óseo activo; lo que contribuye a la regulación de la proliferación de osteoblastos a través de la transducción de señales de serina/treonina quinasa mediante la supresión de la actividad de fosfatasa y homólogo de tensina (287).

Ensayos clínicos han mostrado como los inhibidores selectivos de la COX-2 son capaces de prevenir la osificación heterotópica tras una intervención de prótesis de cadera y reducir este riesgo hasta en un 59% (288,289). Sin embargo, otros estudios de tipo epidemiológico han puesto de manifiesto que las personas en tratamiento con AINEs tenían una mayor masa ósea en comparación con aquellas personas que no recibían este tratamiento., incluso pueden producir una reducción importante en los valores de marcadores de resorción ósea (290,291).

En general, la mayor parte de los ensayos clínicos han demostrado como algunos AINEs retrasan la curación de las fracturas (276,292–294); aunque otros también han concluido que es precisamente la inhibición de la síntesis de PGs, lo que protege contra

la pérdida ósea en determinadas situaciones patológicas (295). Además, hay que tener en cuenta que en ciertas patologías como la osificación mesentérica heterotópica, el tratamiento con AINEs previene la recurrencia de la misma (296). En los casos de osteonecrosis, se aconseja la no administración de AINEs por su efecto pernicioso sobre el osteoblasto (297).

AINEs y osteoblastos.

Existe consenso en la literatura científica sobre el efecto adverso de los AINEs en el tejido óseo como resultado de su acción sobre el osteoblasto. Es conocida la inhibición de la proliferación celular y muerte en los osteoblastos causada por los AINEs, lo que se correlaciona con el efecto de los AINEs sobre la remodelación ósea *in vivo* (276,292). Estudios sobre la acción de diferentes AINEs han puesto de manifiesto como estos pueden disminuir la capacidad proliferativa de los osteoblastos. Por otro lado, también es conocida la acción de estos fármacos sobre el proceso de diferenciación y adhesión en osteoblastos, entre otros parámetros celulares (272,294,298–302).

En lo que se refiere al efecto de los AINEs sobre el crecimiento celular, varios autores han encontrado que estos tienen un efecto adverso dosis – dependiente sobre esta cualidad celular, siendo la indometacina uno de los primeros AINEs estudiados en este sentido (298). Otros AINEs que muestran su efecto sobre el crecimiento tanto *in vitro* (294,300–304), como *in vivo* (305,306), son el diclofenaco, la nimesulida, el dexketoprofeno, el ketorolaco y el ketoprofeno; así como el paracetamol que no siendo un AINE comparte acciones farmacológicas con estos. Por el contrario, otros como el ibuprofeno o el ácido acetil salicílico no afecta a la capacidad proliferativa de los osteoblastos a dosis terapéuticas (294,307). Por su parte, el metamizol produce una ligera

inhibición del crecimiento solo a dosis 10 μ M o mayores (superior a la dosis terapéutica) (302). En este mismo contexto, otros autores encontraron que dosis bajas de ácido acético salicílico no tienen efectos adversos sobre el tejido óseo en ratones (308). El mecanismo por el que los AINEs ejercen su efecto sobre el crecimiento celular en osteoblastos continúa siendo motivo de debate entre la comunidad científica. Este ha sido atribuido por algunos autores a la inhibición de la síntesis de PGs (287); y por otros a su acción sobre el ciclo celular y/o la inducción de la apoptosis (309,310). Estudios en calvaria de rata y en osteoprogenitores han puesto de manifiesto como las dosis terapéuticas de ketorolaco, indometacina o diclofenaco producen muerte celular en osteoblastos deteniendo el ciclo celular en la fase G0/G1, lo que puede suprimir la formación de tejido y la regeneración en el proceso de remodelado óseo (280,311). Algunos antiinflamatorios, tanto esteroideos (p. Ej., dexametasona) como no esteroideos (p. Ej., celecoxib, diclofenaco, piroxicam e indometacina) también suprimen el proceso de proliferación en osteoblastos humanos en cultivo, a través de la detención del ciclo celular en fase G0/G1. La dexametasona y el celecoxib, aunque no los AINEs no selectivos, tienen un efecto citotóxico en los osteoblastos, a través de la inducción de la apoptosis y la necrosis a altas concentraciones. En base a esto, se ha propuesto que los AINEs suprimen la proliferación en osteoblastos a través de un mecanismo no relacionado con la síntesis de PGs (299). A parte, el tratamiento de los osteoblastos durante 24h con indometacina, nimesulida, ketorolaco o dexketoprofeno a dosis terapéuticas reduce la capacidad proliferativa de estos y produce cambios significativos en el ciclo celular, con un mayor porcentaje de células en la fase G0/G1. Sin embargo, el tratamiento con diclofenaco, reduce la capacidad proliferativa en osteoblastos sin producir cambios a nivel del ciclo celular (294,302).

En cuanto al efecto de estos fármacos sobre el proceso de diferenciación de osteoblastos, debemos tener presente que este proceso es complejo y está regulado por factores endógenos (312); aunque la maduración de los osteoblastos también puede ser modulada por diversos factores exógenos (313–317). Varios autores han abordado el efecto de los AINEs sobre la diferenciación en osteoblastos. Algunos estudios ponen de manifiesto como el tratamiento de osteoblastos de calvaria de rata con ketorolaco a dosis de 0,1, 1, 10 y 100 μ M por 10 días produjo un aumento dosis dependiente en los niveles de ALP y Col I intracelular; aunque una dosis de 1000 μ M por periodos mas largos (15 o 20 días) no aumentaron más la actividad de la ALP intracelular (272). Se ha reportado como dosis de 10 μ M por 10 días de ketorolaco pueden disminuir la síntesis de colágeno (281). Adicionalmente, Díaz Rodríguez et al. (300) pudieron de manifiesto la reducción de la concentración de OSC en el sobrenadante de cultivos de la línea MG63 tras el tratamiento con paracetamol a dosis 25 μ M durante 24h. En este sentido, De Luna Bertos *et al.* (318), demostraron en la misma línea celular como el ketoprofeno, el ketorolaco, el metamizol y el ácido acetil salicílico, disminuyen la ALP. Adicionalmente, las células tratadas con estos AINES mostraron una disminución, tanto en el número como en el tamaño de los nódulos de calcio formados durante el proceso de mineralización en comparación con el grupo control. En el mismo contexto, las dosis altas de ácido acetil salicílico (2mM) detuvieron la diferenciación y maduración de las células dendríticas (314), células que han sido relacionadas con los osteoblastos. Posteriormente, se ha reportado como células óseas caninas tratadas con carprofeno, meloxicam, indometacina y robenacoxib, mostraron una disminución en la actividad de la ALP y una supresión de depósitos de calcio, sin encontrar disminución en la síntesis de OSC (319).

El efecto de los AINEs sobre la adhesión celular en osteoblastos también ha sido motivo de estudio. Así, se sabe como la adhesión depende de la expresión de

determinadas moléculas de membrana que permiten y facilitan el proceso de manera reversible y selectiva. Las moléculas de adhesión son receptores funcionales que participan de forma activa en diferentes fenómenos fisiológicos y patológicos. La principal característica de estas moléculas es su capacidad para transducir señales en las células mediante la interacción con sus ligandos, lo que desencadena cambios en la expresión génica y el fenotipo, y produce la inducción o sobreexpresión de ciertas moléculas en la membrana de la célula; cambiando de esta forma el estado de activación celular (320). Los procesos de adhesión y migración celular son importantes en los osteoblastos y en otros tipos de células, adquiriendo especial relevancia en la reparación ósea. Se ha visto como la indometacina y el diclofenaco aumentan la adhesión y reducen la migración de diferentes poblaciones celulares, lo que se torna clínicamente relevante en determinadas situaciones clínicas, como el tratamiento de tumores y el control del dolor y la inflamación en enfermedades autoinmunes (305,321,322). Además, tienen especial importancia en el caso de los implantes o prótesis óseas o en la regeneración de las fracturas, ya que la adhesión célula – célula y célula – superficie también es importante para la formación de callos óseos y la osteointegración (323,324).

La bibliografía muestra claramente que los AINEs en función de su naturaleza y según su dosis pueden ejercer un efecto sobre el osteoblasto y a su vez sobre el hueso.

BIBLIOGRAFÍA

1. Buck DW, Dumanian GA. Bone biology and physiology: Part I. The fundamentals. *Plast Reconstr Surg*. junio de 2012;129(6):1314-20.
2. Marcus R, Dempster DW, Cauley JA, Feldman D. Osteoporosis. Elsevier; 2013.
3. Tamma R, Ribatti D. Bone Niches, Hematopoietic Stem Cells, and Vessel Formation. *Int J Mol Sci*. 13 de enero de 2017;18(1).
4. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*. noviembre de 2008;3 Suppl 3:S131-139.
5. Singh S, Bray TJP, Hall-Craggs MA. Quantifying bone structure, micro-architecture, and pathophysiology with MRI. *Clin Radiol*. 2018;73(3):221-30.
6. Taichman RS. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood*. 1 de abril de 2005;105(7):2631-9.
7. 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.
8. Cho G, Wu Y, Ackerman JL. Detection of hydroxyl ions in bone mineral by solid-state NMR spectroscopy. *Science*. 16 de mayo de 2003;300(5622):1123-7.
9. van der Harst MR, Brama PAJ, van de Lest CHA, Kiers GH, DeGroot J, van Weeren PR. An integral biochemical analysis of the main constituents of articular cartilage, subchondral and trabecular bone. *Osteoarthr Cartil*. septiembre de 2004;12(9):752-61.
10. Wu Y, Ackerman JL, Strawich ES, Rey C, Kim H-M, Glimcher MJ. Phosphate ions in bone: identification of a calcium-organic phosphate complex by ³¹P solid-state NMR spectroscopy at early stages of mineralization. *Calcif Tissue Int*. mayo de 2003;72(5):610-26.
11. Christoffersen J, Landis WJ. A contribution with review to the description of mineralization of bone and other calcified tissues in vivo. *Anat Rec*. agosto de 1991;230(4):435-50.
12. 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.
13. Ricard-Blum S. The Collagen Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. enero de 2011;3(1).
14. Hlaing TT, Compston JE. Biochemical markers of bone turnover - uses and limitations. *Ann Clin Biochem*. marzo de 2014;51(Pt 2):189-202.
15. Traub W, Arad T, Weiner S. Origin of mineral crystal growth in collagen fibrils. *Matrix*. agosto de 1992;12(4):251-5.
16. Brodsky B, Persikov AV. Molecular structure of the collagen triple helix. *Adv Protein Chem*. 2005;70:301-39.

17. Vescovi JD, VanHeest JL, De Souza MJ. Short-term response of bone turnover to low-dose oral contraceptives in exercising women with hypothalamic amenorrhea. *Contraception*. febrero de 2008;77(2):97-104.
18. Ryder KM, Tanner SB, Carbone L, Williams JE, Taylor HM, Bush A, et al. Teriparatide is safe and effectively increases bone biomarkers in institutionalized individuals with osteoporosis. *J Bone Miner Metab*. marzo de 2010;28(2):233-9.
19. Mahonen A, Jukkola A, Risteli L, Risteli J, Mäenpää PH. Type I procollagen synthesis is regulated by steroids and related hormones in human osteosarcoma cells. *J Cell Biochem*. 1 de febrero de 1998;68(2):151-63.
20. Hernández MV, Guañabens N, Alvarez L, Monegal A, Peris P, Riba J, et al. Immunocytochemical evidence on the effects of glucocorticoids on type I collagen synthesis in human osteoblastic cells. *Calcif Tissue Int*. marzo de 2004;74(3):284-93.
21. Byers PH. Brittle bones--fragile molecules: disorders of collagen gene structure and expression. *Trends Genet*. septiembre de 1990;6(9):293-300.
22. Myllyharju J, Kivirikko KI. Collagens and collagen-related diseases. *Ann Med*. febrero de 2001;33(1):7-21.
23. Klein RF, Wires KM. Regulation of osteoblastic gene expression by lead. *Endocrinology*. junio de 1993;132(6):2531-7.
24. Roach HI. Association of matrix acid and alkaline phosphatases with mineralization of cartilage and endochondral bone. *Histochem J*. enero de 1999;31(1):53-61.
25. Hoshi K, Ozawa H. [Control of calcification by extracellular matrix]. *Clin Calcium*. junio de 2004;14(6):16-22.
26. Delany AM, Amling M, Priemel M, Howe C, Baron R, Canalis E. Osteopenia and decreased bone formation in osteonectin-deficient mice. *J Clin Invest*. abril de 2000;105(7):915-23.
27. Boskey AL, Moore DJ, Amling M, Canalis E, Delany AM. Infrared analysis of the mineral and matrix in bones of osteonectin-null mice and their wildtype controls. *J Bone Miner Res*. junio de 2003;18(6):1005-11.
28. Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell*. octubre de 1981;26(1 Pt 1):99-105.
29. Roach HI. Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption. *Cell Biol Int*. junio de 1994;18(6):617-28.
30. Hohenester E, Engel J. Domain structure and organisation in extracellular matrix proteins. *Matrix Biol*. marzo de 2002;21(2):115-28.
31. Sage H, Vernon RB, Funk SE, Everitt EA, Angello J. SPARC, a secreted protein associated with cellular proliferation, inhibits cell spreading in vitro and exhibits Ca²⁺-dependent binding to the extracellular matrix. *J Cell Biol*. julio de 1989;109(1):341-56.
32. Adams JC, Lawler J. The thrombospondins. *Int J Biochem Cell Biol*. junio de 2004;36(6):961-8.

33. Robey PG, Young MF, Fisher LW, McClain TD. Thrombospondin is an osteoblast-derived component of mineralized extracellular matrix. *Journal of Cell Biology*. 1989;108(2):719-27.
34. Sherbina NV, Bornstein P. Modulation of thrombospondin gene expression during osteoblast differentiation in MC3T3-E1 cells. *Bone*. 1992;13(2):197-201.
35. Abbadia Z, Amiral J, Trzeciak M-C, Delmas PD, Clezardin P. The growth-supportive effect of thrombospondin (TSP1) and the expression of TSP1 by human MG-63 osteoblastic cells are both inhibited by dexamethasone. *FEBS Letters*. 6 de diciembre de 1993;335(2):161-6.
36. Carron JA, Walsh CA, Fraser WD, Gallagher JA. Thrombospondin promotes resorption by osteoclasts in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 24 de agosto de 1995;213(3):1017-25.
37. Amend SR, Uluckan O, Hurchla M, Leib D, Novack DV, Silva M, et al. Thrombospondin-1 Regulates Bone Homeostasis Through Effects on Bone Matrix Integrity and Nitric Oxide Signaling in Osteoclasts. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2015;30(1):106-15.
38. Rodan SB, Rodan GA. Integrin function in osteoclasts. *J Endocrinol*. septiembre de 1997;154 Suppl:S47-56.
39. Wrana JL, Maeno M, Hawrylyshyn B, Yao KL, Domenicucci C, Sodek J. Differential effects of transforming growth factor-beta on the synthesis of extracellular matrix proteins by normal fetal rat calvarial bone cell populations. *J Cell Biol*. marzo de 1988;106(3):915-24.
40. Eielson C, Kaplan D, Mitnick MA, Paliwal I, Insogna K. Estrogen modulates parathyroid hormone-induced fibronectin production in human and rat osteoblast-like cells. *Endocrinology*. 1 de octubre de 1994;135(4):1639-44.
41. Bockman RS, Guidon PT, Pan LC, Salvatori R, Kawaguchi A. Gallium nitrate increases type I collagen and fibronectin mRNA and collagen protein levels in bone and fibroblast cells. *J Cell Biochem*. agosto de 1993;52(4):396-403.
42. Quintana Plaza J, Benito Garzón L, Bravo Gimenez B, Fernández-Montes Moraleda B, Collía F, Rodríguez-Lorenzo LM. Application of calcium phosphates and fibronectin as complementary treatment for osteoporotic bone fractures. septiembre de 2016;47(3):S15-21.
43. Huq NL, Cross KJ, Ung M, Reynolds EC. A review of protein structure and gene organisation for proteins associated with mineralised tissue and calcium phosphate stabilisation encoded on human chromosome 4. *Arch Oral Biol*. julio de 2005;50(7):599-609.
44. Chabas D. L'ostéopontine, une molécule aux multiples facettes. *Med Sci (Paris)*. 1 de octubre de 2005;21(10):832-8.
45. Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. *Trends Cell Biol*. febrero de 2006;16(2):79-87.
46. Zierold C, Mings JA, Prahl JM, Reinholz GG, DeLuca HF. Protein synthesis is required for optimal induction of 25-hydroxyvitamin D(3)-24-hydroxylase, osteocalcin, and osteopontin mRNA by 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Arch Biochem Biophys*. 1 de agosto de 2002;404(1):18-24.
47. Fagenholz PJ, Warren SM, Greenwald JA, Bouletreau PJ, Spector JA, Crisera FE, et al. Osteoblast gene expression is differentially regulated by TGF-beta isoforms. *J Craniofac Surg*. marzo de 2001;12(2):183-90.

48. Gorski JP. Acidic phosphoproteins from bone matrix: A structural rationalization of their role in biomineralization. *Calcif Tissue Int.* 1 de mayo de 1992;50(5):391-6.
49. Fisher LW, Torchia DA, Fohr B, Young MF, Fedarko NS. Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun.* 19 de enero de 2001;280(2):460-5.
50. Gericke A, Qin C, Spevak L, Fujimoto Y, Butler WT, Sørensen ES, et al. Importance of phosphorylation for osteopontin regulation of biomineralization. *Calcif Tissue Int.* julio de 2005;77(1):45-54.
51. Bailey S, Karsenty G, Gundberg C, Vashishth D. Osteocalcin and osteopontin influence bone morphology and mechanical properties. *Ann N Y Acad Sci.* diciembre de 2017;1409(1):79-84.
52. Ganss B, Kim RH, Sodek J. Bone Sialoprotein. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine.* 1 de enero de 1999;10(1):79-98.
53. Fisher LW, Fedarko NS. Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins. *Connect Tissue Res.* 2003;44 Suppl 1:33-40.
54. Huq NL, Cross KJ, Ung M, Reynolds EC. A review of protein structure and gene organisation for proteins associated with mineralised tissue and calcium phosphate stabilisation encoded on human chromosome 4. *Arch Oral Biol.* julio de 2005;50(7):599-609.
55. Andrews ATDB, Herring GM, Kent PW. Some studies on the composition of bovine cortical-bone sialoprotein. *Biochem J.* septiembre de 1967;104(3):705-15.
56. Visser NA, Vankampen GP, Dekoning MH, Vanderkorst JK. The effects of loading on the synthesis of biglycan and decorin in intact mature articular cartilage in vitro. *Connect Tissue Res.* 1994;30(4):241-50.
57. Barroga EF, Kadosawa T, Okumura M, Fujinaga T. Influence of Vitamin D and Retinoids on the Induction of Functional Differentiation In Vitro of Canine Osteosarcoma Clonal Cells. *The Veterinary Journal.* 1 de marzo de 2000;159(2):186-93.
58. Watanabe H, Yamada Y. Chondrodysplasia of gene knockout mice for aggrecan and link protein. *Glycoconj J.* 1 de mayo de 2002;19(4):269-73.
59. Heinegård D, Oldberg A. Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB J.* julio de 1989;3(9):2042-51.
60. Nakamura M, Sone S, Takahashi I, Mizoguchi I, Echigo S, Sasano Y. Expression of Versican and ADAMTS1, 4, and 5 During Bone Development in the Rat Mandible and Hind Limb. *J Histochem Cytochem.* diciembre de 2005;53(12):1553-62.
61. Antosz ME, Bellows CG, Aubin JE. Biphasic effects of epidermal growth factor on bone nodule formation by isolated rat calvaria cells in vitro. *J Bone Miner Res.* octubre de 1987;2(5):385-93.
62. Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Robey PG. Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues. *J Histochem Cytochem.* noviembre de 1990;38(11):1549-63.
63. Boskey AL, Spevak L, Doty SB, Rosenberg L. Effects of bone CS-proteoglycans, DS-decorin, and DS-biglycan on hydroxyapatite formation in a gelatin gel. *Calcif Tissue Int.* octubre de 1997;61(4):298-305.

64. Hedbom E, Heinegård D. Binding of fibromodulin and decorin to separate sites on fibrillar collagens. *J Biol Chem.* 25 de diciembre de 1993;268(36):27307-12.
65. Goldberg M, Septier D, Oldberg A, Young MF, Ameye LG. Fibromodulin-deficient mice display impaired collagen fibrillogenesis in predentin as well as altered dentin mineralization and enamel formation. *J Histochem Cytochem.* mayo de 2006;54(5):525-37.
66. Sommarin Y, Wendel M, Shen Z, Hellman U, Heinegård D. Osteoadherin, a Cell-binding Keratan Sulfate Proteoglycan in Bone, Belongs to the Family of Leucine-rich Repeat Proteins of the Extracellular Matrix. *J Biol Chem.* 7 de marzo de 1998;273(27):16723-9.
67. Buchaille R, Couble ML, Magloire H, Bleicher F. Expression of the small leucine-rich proteoglycan osteoadherin/osteomodulin in human dental pulp and developing rat teeth. *Bone.* agosto de 2000;27(2):265-70.
68. Wendel M, Sommarin Y, Heinegård D. Bone Matrix Proteins: Isolation and Characterization of a Novel Cell-binding Keratan Sulfate Proteoglycan (Osteoadherin) from Bovine Bone. *The Journal of Cell Biology.* 4 de mayo de 1998;141(3):839-47.
69. Solheim E. Growth factors in bone. *Int Orthop.* 1998;22(6):410-6.
70. Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Arch Biochem Biophys.* 1 de noviembre de 2014;561:3-12.
71. Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Arch Biochem Biophys.* 1 de noviembre de 2014;561:3-12.
72. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Parfitt AM, Manolagas SC. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): Modulation by growth factors and cytokines. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* mayo de 1998;13(5):793-802.
73. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.* abril de 2000;21(2):115-37.
74. Cerri PS. Osteoblasts engulf apoptotic bodies during alveolar bone formation in the rat maxilla. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology.* 2005;286A(1):833-40.
75. Roeder E, Matthews BG, Kalajzic I. Visual reporters for study of the osteoblast lineage. *Bone.* 2016;92:189-95.
76. Miller SC, Jee WS. The bone lining cell: a distinct phenotype? *Calcif Tissue Int.* julio de 1987;41(1):1-5.
77. Hulmes DJS. Collagen Diversity, Synthesis and Assembly. En: Fratzl P, editor. *Collagen: Structure and Mechanics* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2008 [citado 20 de junio de 2019]. p. 15-47. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-0-387-73906-9_2
78. Boraschi-Diaz I, Wang JP, Mort JS, Komarova SV. Collagen Type I as a Ligand for Receptor-Mediated Signaling. En: *Front Phys.* 2017.
79. Kelm RJ, Hair GA, Mann KG, Grant BW. Characterization of human osteoblast and megakaryocyte-derived osteonectin (SPARC). *Blood.* 15 de diciembre de 1992;80(12):3112-9.
80. Noda M, Denhardt DT. Regulation of osteopontin gene expression in osteoblasts. *Ann*

N Y Acad Sci. 21 de abril de 1995;760:242-8.

81. Greaves MF, Brown G, Rapson NT, Lister TA. Antisera to acute lymphoblastic leukemia cells. *Clin Immunol Immunopathol.* mayo de 1975;4(1):67-84.
82. Ritz J, Pesando JM, Notis-McConarty J, Lazarus H, Schlossman SF. A monoclonal antibody to human acute lymphoblastic leukaemia antigen. *Nature.* 7 de febrero de 1980;283(5747):583-5.
83. Shipp MA, Tarr GE, Chen CY, Switzer SN, Hersh LB, Stein H, et al. CD10/neutral endopeptidase 24.11 hydrolyzes bombesin-like peptides and regulates the growth of small cell carcinomas of the lung. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1 de diciembre de 1991;88(23):10662-6.
84. Shipp MA, Look AT. Hematopoietic differentiation antigens that are membrane-associated enzymes: cutting is the key! *Blood.* 15 de agosto de 1993;82(4):1052-70.
85. 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.
86. 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.
87. 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.
88. 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.
89. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol.* octubre de 2001;189(1):54-63.
90. Domev H, Amit M, Laevsky I, Dar A, Itskovitz-Eldor J. Efficient engineering of vascularized ectopic bone from human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A.* noviembre de 2012;18(21-22):2290-302.
91. Gao Y, Feng Y, Shen JK, Lin M, Choy E, Cote GM, et al. CD44 is a direct target of miR-199a-3p and contributes to aggressive progression in osteosarcoma. *Sci Rep.* 16 de junio de 2015;5:11365.
92. Yin T, Wang G, He S, Liu Q, Sun J, Wang Y. Human cancer cells with stem cell-like phenotype exhibit enhanced sensitivity to the cytotoxicity of IL-2 and IL-15 activated natural killer cells. *Cell Immunol.* febrero de 2016;300:41-5.
93. 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.
94. Hughes DE, Salter DM, Simpson R. CD44 expression in human bone: a novel marker of osteocytic differentiation. *J Bone Miner Res.* enero de 1994;9(1):39-44.
95. Jamal HH, Aubin JE. CD44 expression in fetal rat bone: in vivo and in vitro analysis. *Exp Cell Res.* 15 de marzo de 1996;223(2):467-77.

96. Favaloro EJ, Bradstock KF, Kabral A, Grimsley P, Zowtyj H, Zola H. Further characterization of human myeloid antigens (gp160,95; gp150; gp67): investigation of epitopic heterogeneity and non-haemopoietic distribution using panels of monoclonal antibodies belonging to CD-11b, CD-13 and CD-33. *Br J Haematol.* junio de 1988;69(2):163-71.
97. Mina-Osorio P. The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target. *Trends Mol Med.* agosto de 2008;14(8):361-71.
98. Zini S, Fournie-Zaluski MC, Chauvel E, Roques BP, Corvol P, Llorens-Cortes C. Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci USA.* 15 de octubre de 1996;93(21):11968-73.
99. Santos AN, Langner J, Herrmann M, Riemann D. Aminopeptidase N/CD13 is directly linked to signal transduction pathways in monocytes. *Cell Immunol.* 10 de abril de 2000;201(1):22-32.
100. Mina-Osorio P, Ortega E. Aminopeptidase N (CD13) functionally interacts with FcγR3s in human monocytes. *J Leukoc Biol.* junio de 2005;77(6):1008-17.
101. Winnicka B, O'Connor C, Schacke W, Vernier K, Grant CL, Fenteany FH, et al. CD13 is dispensable for normal hematopoiesis and myeloid cell functions in the mouse. *J Leukoc Biol.* agosto de 2010;88(2):347-59.
102. Christiansen I, Gidlöf C, Wallgren AC, Simonsson B, Tötterman TH. Serum levels of soluble intercellular adhesion molecule 1 are increased in chronic B-lymphocytic leukemia and correlate with clinical stage and prognostic markers. *Blood.* 1 de noviembre de 1994;84(9):3010-6.
103. Christiansen I, Enblad G, Kälkner KM, Gidlöf C, Glimelius B, Tötterman TH. Soluble ICAM-1 in Hodgkin's disease: a promising independent predictive marker for survival. *Leuk Lymphoma.* octubre de 1995;19(3-4):243-51.
104. Duperray A, Languino LR, Plescia J, McDowall A, Hogg N, Craig AG, et al. Molecular Identification of a Novel Fibrinogen Binding Site on the First Domain of ICAM-1 Regulating Leukocyte-Endothelium Bridging. *J Biol Chem.* 1 de marzo de 1997;272(1):435-41.
105. Huang W-C, Chan S-T, Yang T-L, Tzeng C-C, Chen C-C. Inhibition of ICAM-1 gene expression, monocyte adhesion and cancer cell invasion by targeting IKK complex: molecular and functional study of novel alpha-methylene-gamma-butyrolactone derivatives. *Carcinogenesis.* octubre de 2004;25(10):1925-34.
106. Zimmerman T, Blanco FJ. Inhibitors targeting the LFA-1/ICAM-1 cell-adhesion interaction: design and mechanism of action. *Curr Pharm Des.* 2008;14(22):2128-39.
107. Lawson C, Wolf S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol Rep.* febrero de 2009;61(1):22-32.
108. 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.
109. 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.* junio de 1988;106(6):2139-51.
110. 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.
111. 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*. mayo de 1997;89(5):755-64.
112. Fakhry M, Hamade E, Badran B, Buchet R, Magne D. Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. *World J Stem Cells*. 26 de octubre de 2013;5(4):136-48.
113. Hu H, Hilton MJ, Tu X, Yu K, Ornitz DM, Long F. Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *Development*. enero de 2005;132:49-60.
114. Glass D, Bialek P, Ahn J, Starbuck M, Patel M, Clevers H, et al. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell*. mayo de 2005;8(5).
115. Montero A, Okada Y, Tomita M, Ito M, Tsurukami H, Nakamura T, et al. Disruption of the fibroblast growth factor-2 gene results in decreased bone mass and bone formation. *J Clin Invest*. abril de 2000;105(8):1085-93.
116. Kapinas K, Kessler C, Ricks T, Gronowicz G, Delany AM. miR-29 Modulates Wnt Signaling in Human Osteoblasts through a Positive Feedback Loop. *J Biol Chem*. 13 de agosto de 2010;285(33):25221-31.
117. Zhang Y, Xie RL, Croce CM, Stein JL, Lian JB, Wijnen AJ van, et al. A program of microRNAs controls osteogenic lineage progression by targeting transcription factor *Runx2*. *PROC NAT ACAD OF SCI (USA)*. 14 de junio de 2011;108(24):9863-8.
118. Buo AM, Stains JP. Gap junctional regulation of signal transduction in bone cells. *FEBS Letters*. 17 de abril de 2014;588(8):1315-21.
119. Yoshiko Y, Candelieri GA, Maeda N, Aubin JE. Osteoblast Autonomous Pi Regulation via *Pit1* Plays a Role in Bone Mineralization. *Mol Cell Biol*. junio de 2007;27(12):4465-74.
120. Anderson HC. Matrix Vesicle Involvement in Osteoarthritis and Crystal Deposition Arthritis. En 2003.
121. Twine NA, Chen L, Pang CN, Wilkins MR, Kassem M. Identification of differentiation-stage specific markers that define the ex vivo osteoblastic phenotype. *Bone*. 67:23-32.
122. Hall BK, Miyake T. All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays*. febrero de 2000;22(2):138-47.
123. Brugmann SA, Tapadia MD, Helms JA. The molecular origins of species-specific facial pattern. *Curr Top Dev Biol*. 2006;73:1-42.
124. Thesleff I. The genetic basis of tooth development and dental defects. *Am J Med Genet A*. 1 de diciembre de 2006;140(23):2530-5.
125. Malaval L, Aubin JE. Biphasic effects of leukemia inhibitory factor on osteoblastic differentiation. *J Cell Biochem Suppl*. 2001;Suppl 36:63-70.
126. Malaval L, Liu F, Vernallis AB, Aubin JE. GP130/OSMR is the only LIF/IL-6 family receptor complex to promote osteoblast differentiation of calvaria progenitors. *Journal of Cellular Physiology*. 2005;204(2):585-93.

127. Liu F, Malaval L, Aubin JE. Global amplification polymerase chain reaction reveals novel transitional stages during osteoprogenitor differentiation. *Journal of Cell Science*. 1 de mayo de 2003;116(9):1787-96.
128. Kim DH, Yoo KH, Choi KS, Choi J, Choi S-Y, Yang S-E, et al. Gene expression profile of cytokine and growth factor during differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cell. *Cytokine*. 21 de julio de 2005;31(2):119-26.
129. Liu Y, Bhat RA, Seestaller-Wehr LM, Fukayama S, Mangine A, Moran RA, et al. The orphan receptor tyrosine kinase Ror2 promotes osteoblast differentiation and enhances ex vivo bone formation. *Mol Endocrinol*. febrero de 2007;21(2):376-87.
130. Zayzafoon M, Gathings WE, McDonald JM. Modeled microgravity inhibits osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells and increases adipogenesis. *Endocrinology*. mayo de 2004;145(5):2421-32.
131. Ontiveros C, Irwin R, Wiseman RW, McCabe LR. Hypoxia suppresses runx2 independent of modeled microgravity. *Journal of Cellular Physiology*. 2004;200(2):169-76.
132. Banerjee C, McCabe LR, Choi JY, Hiebert SW, Stein JL, Stein GS, et al. Runt homology domain proteins in osteoblast differentiation: AML3/CBFA1 is a major component of a bone-specific complex. *J Cell Biochem*. 1 de julio de 1997;66(1):1-8.
133. 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.
134. 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.
135. Skillington J, Choy L, Derynck R. Bone morphogenetic protein and retinoic acid signaling cooperate to induce osteoblast differentiation of preadipocytes. *J Cell Biol*. 14 de octubre de 2002;159(1):135-46.
136. Bennett CN, Longo KA, Wright WS, Suva LJ, Lane TF, Hankenson KD, et al. Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1 de marzo de 2005;102(9):3324-9.
137. Lee JS, Lee JM, Im GI. Electroporation-mediated transfer of Runx2 and Osterix genes to enhance osteogenesis of adipose stem cells. *Biomaterials*. enero de 2011;32(3):760-8.
138. Celil AB, Campbell PG. BMP-2 and Insulin-like Growth Factor-I Mediate Osterix (Osx) Expression in Human Mesenchymal Stem Cells via the MAPK and Protein Kinase D Signaling Pathways. *J Biol Chem*. 9 de septiembre de 2005;280(36):31353-9.
139. Lee M-H, Kwon T-G, Park H-S, Wozney JM, Ryoo H-M. BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. *Biochem Biophys Res Commun*. 26 de septiembre de 2003;309(3):689-94.
140. Nishio Y, Dong Y, Paris M, O'Keefe RJ, Schwarz EM, Drissi H. Runx2-mediated regulation of the zinc finger Osterix/Sp7 gene. *Gene*. 10 de mayo de 2006;372:62-70.
141. Bandyopadhyay A, Tsuji K, Cox K, Harfe BD, Rosen V, Tabin CJ. Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. *PLoS Genet*. diciembre de 2006;2(12):e216.

142. Shen B, Wei A, Whittaker S, Williams LA, Tao H, Ma DDF, et al. The role of BMP-7 in chondrogenic and osteogenic differentiation of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells in vitro. *J Cell Biochem.* 1 de febrero de 2010;109(2):406-16.
143. Hamidouche Z, Fromigué O, Nuber U, Vaudin P, Pages J-C, Ebert R, et al. Autocrine fibroblast growth factor 18 mediates dexamethasone-induced osteogenic differentiation of murine mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol.* agosto de 2010;224(2):509-15.
144. Shi X, Shi W, Li Q, Song B, Wan M, Bai S, et al. A glucocorticoid-induced leucine-zipper protein, GILZ, inhibits adipogenesis of mesenchymal cells. *EMBO Rep.* abril de 2003;4(4):374-80.
145. Gori F, Thomas T, Hicok KC, Spelsberg TC, Riggs BL. Differentiation of human marrow stromal precursor cells: bone morphogenetic protein-2 increases OSF2/CBFA1, enhances osteoblast commitment, and inhibits late adipocyte maturation. *J Bone Miner Res.* septiembre de 1999;14(9):1522-35.
146. Miller SC, Jee WS. The bone lining cell: a distinct phenotype? *Calcif Tissue Int.* julio de 1987;41(1):1-5.
147. Del Fattore A, Teti A. The tight relationship between osteoclasts and the immune system. *Inflamm Allergy Drug Targets.* junio de 2012;11(3):181-7.
148. Canalis E, Rydziel S, Delany AM, Varghese S, Jeffrey JJ. Insulin-like growth factors inhibit interstitial collagenase synthesis in bone cell cultures. *Endocrinology.* 1 de abril de 1995;136(4):1348-54.
149. Pereira RC, Canalis E. Parathyroid hormone increases mac25/insulin-like growth factor-binding protein-related protein-1 expression in cultured osteoblasts. *Endocrinology.* mayo de 1999;140(5):1998-2003.
150. Bikle DD, Sakata T, Leary C, Elalieh H, Ginzinger D, Rosen CJ, et al. Insulin-like growth factor I is required for the anabolic actions of parathyroid hormone on mouse bone. *J Bone Miner Res.* septiembre de 2002;17(9):1570-8.
151. Qiao M, Shapiro P, Kumar R, Passaniti A. Insulin-like growth factor-1 regulates endogenous RUNX2 activity in endothelial cells through a phosphatidylinositol 3-kinase/ERK-dependent and Akt-independent signaling pathway. *J Biol Chem.* 8 de octubre de 2004;279(41):42709-18.
152. Minuto F, Palermo C, Arvigo M, Barreca AM. The IGF system and bone. *J Endocrinol Invest.* 2005;28(8 Suppl):8-10.
153. Faibish D, Ott SM, Boskey AL. Mineral changes in osteoporosis: a review. *Clin Orthop Relat Res.* febrero de 2006;443:28-38.
154. Yakar S, Boussein ML, Canalis E, Sun H, Glatt V, Gundberg C, et al. The ternary IGF complex influences postnatal bone acquisition and the skeletal response to intermittent parathyroid hormone. *J Endocrinol.* mayo de 2006;189(2):289-99.
155. Jiang J, Lichtler AC, Gronowicz GA, Adams DJ, Clark SH, Rosen CJ, et al. Transgenic mice with osteoblast-targeted insulin-like growth factor-I show increased bone remodeling. *Bone.* septiembre de 2006;39(3):494-504.
156. Celil AB, Campbell PG. BMP-2 and insulin-like growth factor-I mediate Osterix (Osx) expression in human mesenchymal stem cells via the MAPK and protein kinase D signaling pathways. *J Biol Chem.* 9 de septiembre de 2005;280(36):31353-9.

157. Koch H, Jadlowiec JA, Campbell PG. Insulin-like growth factor-I induces early osteoblast gene expression in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* diciembre de 2005;14(6):621-31.
158. Shalhoub V, Aslam F, Breen E, van Wijnen A, Bortell R, Stein GS, et al. Multiple levels of steroid hormone-dependent control of osteocalcin during osteoblast differentiation: glucocorticoid regulation of basal and vitamin D stimulated gene expression. *J Cell Biochem.* 1 de mayo de 1998;69(2):154-68.
159. Ishida Y, Heersche JN. Glucocorticoid-induced osteoporosis: both in vivo and in vitro concentrations of glucocorticoids higher than physiological levels attenuate osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res.* diciembre de 1998;13(12):1822-6.
160. Bodine PVN. Estrogen Receptor- Is Developmentally Regulated during Osteoblast Differentiation and Contributes to Selective Responsiveness of Gene Expression. *Endocrinology.* 1 de abril de 1998;139(4):2048-57.
161. Marotti G, Ferretti M, Remaggi F, Palumbo C. Quantitative evaluation on osteocyte canalicular density in human secondary osteons. *Bone.* 1 de enero de 1995;16(1):125-8.
162. Marotti G. The structure of bone tissues and the cellular control of their deposition. *Ital J Anat Embryol.* diciembre de 1996;101(4):25-79.
163. Mullender MG, van der Meer DD, Huiskes R, Lips P. Osteocyte density changes in aging and osteoporosis. *Bone.* febrero de 1996;18(2):109-13.
164. Teti A, Zallone A. Do osteocytes contribute to bone mineral homeostasis? Osteocytic osteolysis revisited. *Bone.* enero de 2009;44(1):11-6.
165. Noble BS. The osteocyte lineage. *Arch Biochem Biophys.* 15 de mayo de 2008;473(2):106-11.
166. Civitelli R. Cell-Cell Communication in the Osteoblast/Osteocyte Lineage. *Arch Biochem Biophys.* 15 de mayo de 2008;473(2):188-92.
167. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res.* febrero de 2011;26(2):229-38.
168. Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn.* enero de 2006;235(1):176-90.
169. Donahue HJ, McLeod KJ, Rubin CT, Andersen J, Grine EA, Hertzberg EL, et al. Cell-to-cell communication in osteoblastic networks: Cell line-dependent hormonal regulation of gap junction function. *Journal of Bone and Mineral Research.* 1995;10(6):881-9.
170. Mosley JR. Osteoporosis and bone functional adaptation: Mechanobiological regulation of bone architecture in growing and adult bone, a review. 2000;11.
171. 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.* enero de 2002;17(1):77-90.
172. Andersen TL, Sondergaard TE, Skorzynska KE, Dagnaes-Hansen F, Plesner TL, Hauge EM, et al. A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone. *Am J Pathol.* enero de 2009;174(1):239-47.
173. Boyce BF, Hughes DE, Wright KR, Xing L, Dai A. Recent advances in bone biology

provide insight into the pathogenesis of bone diseases. *Lab Invest.* febrero de 1999;79(2):83-94.

174. Lee S-H, Rho J, Jeong D, Sul J-Y, Kim T, Kim N, et al. v-ATPase V0 subunit d2-deficient mice exhibit impaired osteoclast fusion and increased bone formation. *Nat Med.* diciembre de 2006;12(12):1403-9.

175. Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol.* abril de 2007;7(4):292-304.

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

177. 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. *OsteoporosInt.* 2011;22(1):1-20.

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

179. Phan TCA, Xu J, Zheng MH. Interaction between osteoblast and osteoclast: impact in bone disease. *Histol Histopathol.* 2004;19(4):1325-44.

180. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys.* 15 de mayo de 2008;473(2):139-46.

181. Longhini R, Oliveira PA, Souza Faloni AP, Sasso-Cerri E, Cerri PS. Increased apoptosis in osteoclasts and decreased RANKL immunoreexpression in periodontium of cimetidine-treated rats. *J Anat.* febrero de 2013;222(2):239-47.

182. Longhini R, Aparecida de Oliveira P, Sasso-Cerri E, Cerri PS. Cimetidine reduces alveolar bone loss in induced periodontitis in rat molars. *J Periodontol.* agosto de 2014;85(8):1115-25.

183. de Souza Faloni AP, Schoenmaker T, Azari A, Katchburian E, Cerri PS, de Vries TJ, et al. Jaw and Long Bone Marrows Have a Different Osteoclastogenic Potential. *Calcif Tissue Int.* enero de 2011;88(1):63-74.

184. Charles JF, Aliprantis AO. Osteoclasts: more than 'bone eaters'. *Trends Mol Med.* agosto de 2014;20(8):449-59.

185. Feng X, McDonald JM. Disorders of bone remodeling. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:121-45.

186. Seeman E, Delmas PD. Bone Quality — The Material and Structural Basis of Bone Strength and Fragility. *New England Journal of Medicine.* 25 de mayo de 2006;354(21):2250-61.

187. Kimura S, Nagai A, Onitsuka T, Koga T, Fujiwara T, Kaya H, et al. Induction of experimental periodontitis in mice with *Porphyromonas gingivalis*-adhered ligatures. *J Periodontol.* julio de 2000;71(7):1167-73.

188. Katz J, Yang Q-B, Zhang P, Potempa J, Travis J, Michalek SM, et al. Hydrolysis of epithelial junctional proteins by *Porphyromonas gingivalis* gingipains. *Infect Immun.* mayo de 2002;70(5):2512-8.

189. Hasturk H, Kantarci A, Ebrahimi N, Andry C, Holick M, Jones VL, et al. Topical H2 Antagonist Prevents Periodontitis in a Rabbit Model. *Infect Immun.* abril de 2006;74(4):2402-

14.

190. Li CH, Amar S. Morphometric, Histomorphometric, and Microcomputed Tomographic Analysis of Periodontal Inflammatory Lesions in a Murine Model. *Journal of Periodontology*. 2007;78(6):1120-8.

191. Jain N, Jain GK, Javed S, Iqbal Z, Talegaonkar S, Ahmad FJ, et al. Recent approaches for the treatment of periodontitis. *Drug Discov Today*. noviembre de 2008;13(21-22):932-43.

192. Sobacchi C, Schulz A, Coxon FP, Villa A, Helfrich MH. Osteopetrosis: Genetics, treatment and new insights into osteoclast function. *Nature reviews Endocrinology*. septiembre de 2013;9(9):522-36.

193. 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*. septiembre de 2001;16(9):1575-82.

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

195. Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci*. diciembre de 2006;1092:385-96.

196. 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 USA*. 10 de noviembre de 1998;95(23):13453-8.

197. 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.

198. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science*. 1 de septiembre de 2000;289(5484):1504-8.

199. 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.

200. Arana-Chavez V, Soares A, Katchburian E. Junctions between Early Developing Osteoblasts of Rat Calvaria as Revealed by Freeze-Fracture and Ultrathin Section Electron Microscopy. *Arch Histol Cytol*. agosto de 1995;58(3):285-92.

201. Anderson HC. Matrix vesicles and calcification. *Curr Rheumatol Rep*. 1 de mayo de 2003;5(3):222-6.

202. Boivin G, Meunier PJ. The Degree of Mineralization of Bone Tissue Measured by Computerized Quantitative Contact Microradiography. *Calcif Tissue Int*. 1 de junio de 2002;70(6):503-11.

203. Boivin G, Bala Y, Doublier A, Farlay D, Ste-Marie LG, Meunier PJ, et al. The role of mineralization and organic matrix in the microhardness of bone tissue from controls and osteoporotic patients. *Bone*. septiembre de 2008;43(3):532-8.

204. Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, et al. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res*. marzo de 1998;13(3):325-49.

205. Rachez C, Freedman LP. Mechanisms of gene regulation by vitamin D(3) receptor: a network of coactivator interactions. *Gene*. 4 de abril de 2000;246(1-2):9-21.
206. Demay MB. Mechanism of vitamin D receptor action. *Ann N Y Acad Sci*. abril de 2006;1068:204-13.
207. Riggs BL, Melton LJ. The prevention and treatment of osteoporosis. *N Engl J Med*. 27 de agosto de 1992;327(9):620-7.
208. Turner RT, Riggs BL, Spelsberg TC. Skeletal effects of estrogen. *Endocr Rev*. junio de 1994;15(3):275-300.
209. Eastell R. Treatment of postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med*. 12 de marzo de 1998;338(11):736-46.
210. 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.
211. Siebler T, Robson H, Shalet SM, Williams GR. Glucocorticoids, thyroid hormone and growth hormone interactions: implications for the growth plate. *Horm Res*. 2001;56 Suppl 1:7-12.
212. Bassett JHD, Williams GR. The molecular actions of thyroid hormone in bone. *Trends Endocrinol Metab*. octubre de 2003;14(8):356-64.
213. Nilsson O, Marino R, De Luca F, Phillip M, Baron J. Endocrine regulation of the growth plate. *Horm Res*. 2005;64(4):157-65.
214. Hume DA, Loutit JF, Gordon S. The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80: macrophages of bone and associated connective tissue. *J Cell Sci*. marzo de 1984;66:189-94.
215. Chang MK, Raggatt L-J, Alexander KA, Kuliwaba JS, Fazzalari NL, Schroder K, et al. Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and mouse bone lining tissues and regulate osteoblast function in vitro and in vivo. *J Immunol*. 15 de julio de 2008;181(2):1232-44.
216. Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol*. octubre de 2008;19(5):459-66.
217. Pape H-C, Marcucio R, Humphrey C, Colnot C, Knobe M, Harvey EJ. Trauma-induced inflammation and fracture healing. *J Orthop Trauma*. septiembre de 2010;24(9):522-5.
218. Xing Z, Lu C, Hu D, Yu Y, Wang X, Colnot C, et al. Multiple roles for CCR2 during fracture healing. *Dis Model Mech*. agosto de 2010;3(7-8):451-8.
219. Melino G. The Sirens' song. *Nature*. 5 de julio de 2001;412(6842):23.
220. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell Death in Disease: Mechanisms and Emerging Therapeutic Concepts. *N Engl J Med*. 15 de octubre de 2009;361(16):1570-83.
221. Lindholm PF, Lu Y, Adley BP, Vladislav T, Jovanovic B, Sivapurapu N, et al. Role of monocyte-lineage cells in prostate cancer cell invasion and tissue factor expression. *Prostate*. 1 de noviembre de 2010;70(15):1672-82.
222. Steiner JL, Murphy EA. Importance of chemokine (CC-motif) ligand 2 in breast cancer.

Int J Biol Markers. 8 de octubre de 2012;27(3):e179-185.

223. Tang X. Tumor-associated macrophages as potential diagnostic and prognostic biomarkers in breast cancer. *Cancer Lett.* 10 de mayo de 2013;332(1):3-10.
224. Bost KL, Ramp WK, Nicholson NC, Bento JL, Marriott I, Hudson MC. Staphylococcus aureus infection of mouse or human osteoblasts induces high levels of interleukin-6 and interleukin-12 production. *J Infect Dis.* diciembre de 1999;180(6):1912-20.
225. Bost KL, Bento JL, Ellington JK, Marriott I, Hudson MC. Induction of colony-stimulating factor expression following Staphylococcus or Salmonella interaction with mouse or human osteoblasts. *Infect Immun.* septiembre de 2000;68(9):5075-83.
226. Bost KL, Bento JL, Petty CC, Schrum LW, Hudson MC, Marriott I. Monocyte chemoattractant protein-1 expression by osteoblasts following infection with Staphylococcus aureus or Salmonella. *J Interferon Cytokine Res.* mayo de 2001;21(5):297-304.
227. Gasper NA, Petty CC, Schrum LW, Marriott I, Bost KL. Bacterium-induced CXCL10 secretion by osteoblasts can be mediated in part through toll-like receptor 4. *Infect Immun.* agosto de 2002;70(8):4075-82.
228. Schrum LW, Marriott I, Butler BR, Thomas EK, Hudson MC, Bost KL. Functional CD40 expression induced following bacterial infection of mouse and human osteoblasts. *Infect Immun.* marzo de 2003;71(3):1209-16.
229. 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.
230. Majno G, Joris I. *Cells, Tissues, and Disease: Principles of General Pathology.* Second Edition. Oxford, New York: Oxford University Press; 2004. 005 p.
231. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell R. *Robbins Basic Pathology.* 9.^a ed. Elsevier Health Sciences; 2007. 960 p.
232. Hunter DC, Brown R, Green T, Thomson C, Skeaff M, Williams S, et al. Changes in markers of inflammation, antioxidant capacity and oxidative stress in smokers following consumption of milk, and milk supplemented with fruit and vegetable extracts and vitamin C. *Int J Food Sci Nutr.* febrero de 2012;63(1):90-102.
233. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 24 de julio de 2008;454(7203):428-35.
234. Barton GM. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J Clin Invest.* 1 de febrero de 2008;118(2):413-20.
235. Drayton DL, Liao S, Mounzer RH, Ruddle NH. Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nat Immunol.* abril de 2006;7(4):344-53.
236. Bacchi S, Palumbo P, Sponta A, Coppolino MF. Clinical pharmacology of non-steroidal anti-inflammatory drugs: a review. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem.* 2012;11(1):52-64.
237. Flórez Beledo J, Armijo Simón JA, Mediavilla Martínez Á. *Farmacología Humana - 6^a Edición.* Edición: 6. Barcelona: Elsevier Masson; 2013. 1216 p.

238. Antman EM, Bennett JS, Daugherty A, Furberg C, Roberts H, Taubert KA, et al. Use of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update for clinicians: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 27 de marzo de 2007;115(12):1634-42.
239. Day RO, Graham GG, Williams KM. Pharmacokinetics of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Baillière's Clinical Rheumatology*. 1 de agosto de 1988;2(2):363-93.
240. Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. *Pharmacol Rev*. 1 de septiembre de 2004;56(3):387-437.
241. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 1998;38(1):97-120.
242. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: Structural, Cellular, and Molecular Biology. *Annual Review of Biochemistry*. 2000;69(1):145-82.
243. Patrignani P, Panara MR, Greco A, Fusco O, Natoli C, Iacobelli S, et al. Biochemical and pharmacological characterization of the cyclooxygenase activity of human blood prostaglandin endoperoxide synthases. *J Pharmacol Exp Ther*. 1 de diciembre de 1994;271(3):1705-12.
244. Murphy JF, Fitzgerald DJ. Vascular endothelial growth factor induces cyclooxygenase-dependent proliferation of endothelial cells via the VEGF-2 receptor. *The FASEB Journal*. 29 de mayo de 2001;15(9):1667-9.
245. Funk CD. Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. *Science*. 30 de noviembre de 2001;294(5548):1871-5.
246. Jones DA, Carlton DP, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J Biol Chem*. 25 de abril de 1993;268(12):9049-54.
247. Harris RC, McKanna JA, Akai Y, Jacobson HR, Dubois RN, Breyer MD. Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest*. 1 de diciembre de 1994;94(6):2504-10.
248. Asano K, Nakamura H, Lilly CM, Klagsbrun M, Drazen JM. Interferon gamma induces prostaglandin G/H synthase-2 through an autocrine loop via the epidermal growth factor receptor in human bronchial epithelial cells. *J Clin Invest*. 1 de marzo de 1997;99(5):1057-63.
249. Jones MK, Wang H, Peskar BM, Levin E, Itani RM, Sarfeh IJ, et al. Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. *Nat Med*. diciembre de 1999;5(12):1418-23.
250. Hoffmann C. COX-2 in Brain and Spinal Cord - Implications for Therapeutic Use. *Current Medicinal Chemistry*. 31 de octubre de 2000;7(11).
251. Popolo AD, Memoli A, Apicella A, Tuccillo C, Palma A di, Ricchi P, et al. IGF-II/IGF-I receptor pathway up-regulates COX-2 mRNA expression and PGE 2 synthesis in Caco-2 human colon carcinoma cells. *Oncogene*. noviembre de 2000;19(48):5517-24.
252. Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woerner BM, et al. Antiangiogenic and Antitumor Activities of Cyclooxygenase-2 Inhibitors. *Cancer Res*. 1 de marzo de 2000;60(5):1306-11.
253. Tamura M, Sebastian S, Gurates B, Yang S, Fang Z, Bulun SE. Vascular Endothelial

Growth Factor Up-Regulates Cyclooxygenase-2 Expression in Human Endothelial Cells. *None*. 1 de julio de 2002;87(7):3504-7.

254. Lukiw WJ, Otlecz A, Lambrou G, Grueninger M, Finley J, Thompson HW, et al. Coordinate Activation of HIF-1 and NF- κ B DNA Binding and COX-2 and VEGF Expression in Retinal Cells by Hypoxia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1 de octubre de 2003;44(10):4163-70.

255. Pichiule P, Chavez JC, LaManna JC. Hypoxic Regulation of Angiopoietin-2 Expression in Endothelial Cells. *J Biol Chem*. 26 de marzo de 2004;279(13):12171-80.

256. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KLT, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 15 de octubre de 2002;99(21):13926-31.

257. Snipes JA, Kis B, Shelness GS, Hewett JA, Busija DW. Cloning and Characterization of Cyclooxygenase-1b (Putative Cyclooxygenase-3) in Rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 1 de mayo de 2005;313(2):668-76.

258. Jones R. Nonsteroidal anti-inflammatory drug prescribing: past, present, and future. *The American Journal of Medicine*. 8 de enero de 2001;110(1, Supplement 1):S4-7.

259. Hernández-Díaz S, Rodríguez LAG. Association Between Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs and Upper Gastrointestinal Tract Bleeding/Perforation: An Overview of Epidemiologic Studies Published in the 1990s. *Arch Intern Med*. 24 de julio de 2000;160(14):2093-9.

260. Schnitzer TJ, Burmester GR, Mysler E, Hochberg MC, Doherty M, Ehsam E, et al. Comparison of lumiracoxib with naproxen and ibuprofen in the Therapeutic Arthritis Research and Gastrointestinal Event Trial (TARGET), reduction in ulcer complications: randomised controlled trial. *The Lancet*. 21 de agosto de 2004;364(9435):665-74.

261. García Rodríguez LA, Barreales Tolosa L. Risk of Upper Gastrointestinal Complications Among Users of Traditional NSAIDs and COXIBs in the General Population. *Gastroenterology*. 1 de febrero de 2007;132(2):498-506.

262. Adderley SR, Fitzgerald DJ. Oxidative Damage of Cardiomyocytes Is Limited by Extracellular Regulated Kinases 1/2-mediated Induction of Cyclooxygenase-2. *J Biol Chem*. 19 de febrero de 1999;274(8):5038-46.

263. Mukherjee D, Nissen SE, Topol EJ. Risk of Cardiovascular Events Associated With Selective COX-2 Inhibitors. *JAMA*. 22 de agosto de 2001;286(8):954-9.

264. Hermann Matthias, Camici Giovanni, Fratton Aisha, Hurlimann David, Tanner Felix C., Hellermann Jens P., et al. Differential Effects of Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors on Endothelial Function in Salt-Induced Hypertension. *Circulation*. 11 de noviembre de 2003;108(19):2308-11.

265. Sowers JR, White WB, Pitt B, Whelton A, Simon LS, Winer N, et al. The Effects of Cyclooxygenase-2 Inhibitors and Nonsteroidal Anti-inflammatory Therapy on 24-Hour Blood Pressure in Patients With Hypertension, Osteoarthritis, and Type 2 Diabetes Mellitus. *Arch Intern Med*. 24 de enero de 2005;165(2):161-8.

266. Zhang J, Ding EL, Song Y. Adverse Effects of Cyclooxygenase 2 Inhibitors on Renal and Arrhythmia Events: Meta-analysis of Randomized Trials. *JAMA*. 4 de octubre de 2006;296(13):1619-32.

267. Feldman HI. Parenteral Ketorolac: The Risk for Acute Renal Failure. *Ann Intern Med.* 1 de febrero de 1997;126(3):193.
268. Ye W, Zhang H, Hillas E, Kohan DE, Miller RL, Nelson RD, et al. Expression and function of COX isoforms in renal medulla: evidence for regulation of salt sensitivity and blood pressure. *American Journal of Physiology-Renal Physiology.* 1 de febrero de 2006;290(2):F542-9.
269. Agúndez JA, Lucena MI, Martínez C, Andrade RJ, Blanca M, Ayuso P, et al. Assessment of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced hepatotoxicity. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology.* 1 de julio de 2011;7(7):817-28.
270. Etcheverry SB, Barrio DA, Cortizo AM, Williams PAM. Three new vanadyl(IV) complexes with non-steroidal anti-inflammatory drugs (Ibuprofen, Naproxen and Tolmetin). Bioactivity on osteoblast-like cells in culture. *Journal of Inorganic Biochemistry.* 1 de enero de 2002;88(1):94-100.
271. Hilário MOE, Terreri MT, Len CA. Antiinflatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. *Jornal de Pediatria.* noviembre de 2006;82(5):S206-12.
272. Ho M-L, Chang J-K, Wang G-J. Antiinflammatory Drug Effects on Bone Repair and Remodeling in Rabbits. *Clinical Orthopaedics and Related Research®.* abril de 1995;313:270.
273. Kawaguchi H, Pilbeam CC, Harrison JR, Raisz LG. The role of prostaglandins in the regulation of bone metabolism. *Clinical Orthopaedics and Related Research.* 1995;(313):36-46.
274. Pape H-C, Marcucio R, Humphrey C, Colnot C, Knobe M, Harvey EJ. Trauma-induced inflammation and fracture healing. *Journal of Orthopaedic Trauma.* 2010;24(9):522-5.
275. Boursinos LA, Karachalios T, Poultsides L, Malizos KN. Do steroids, conventional non-steroidal anti-inflammatory drugs and selective Cox-2 inhibitors adversely affect fracture healing? *Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions.* 2009;9(1):44-52.
276. Gerstenfeld LC, Thiede M, Seibert K, Mielke C, Phippard D, Svagr B, et al. Differential inhibition of fracture healing by non-selective and cyclooxygenase-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Journal of Orthopaedic Research.* 1 de enero de 2003;21(4):670-5.
277. Muñoz J, Navarro C, Noriega V, Pinardi G, Sierralta F, Prieto JC, et al. Synergism between COX-3 inhibitors in two animal models of pain. *Inflammopharmacol.* 1 de abril de 2010;18(2):65-71.
278. Sobolewski C, Cerella C, Dicato M, Ghibelli L, Diederich M. The Role of Cyclooxygenase-2 in Cell Proliferation and Cell Death in Human Malignancies. *International Journal of Cell Biology.* 2010;2010.
279. Radi ZA, Khan NK. Effects of cyclooxygenase inhibition on bone, tendon, and ligament healing. *Inflamm res.* 1 de septiembre de 2005;54(9):358-66.
280. Ho M-L, Chang J-K, Chuang L-Y, Hsu H-K, Wang G-J. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and prostaglandins on osteoblastic functions. *Biochemical Pharmacology.* 15 de septiembre de 1999;58(6):983-90.
281. van Staa TP, Leufkens HGM, Cooper C. Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of fractures. *Bone.* 1 de octubre de 2000;27(4):563-8.
282. Giannoudis PV, MacDonald DA, Matthews SJ, Smith RM, Furlong AJ, De Boer P. Nonunion of the femoral diaphysis. *The Journal of Bone and Joint Surgery British volume.* 1 de

julio de 2000;82-B(5):655-8.

283. Chang J-K, Wang G-J, Tsai S-T, Ho M-L. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Effects on Osteoblastic Cell Cycle, Cytotoxicity, and Cell Death. *Connective Tissue Research*. 1 de enero de 2005;46(4-5):200-10.

284. Vuolteenaho K, Moilanen T, Moilanen E. Non-steroidal anti-inflammatory drugs, cyclooxygenase-2 and the bone healing process. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. 2008;102(1):10-4.

285. Ramsey KE, Daluiski A, Bostrom MP, Shi Y, Nestor BJ, Martin G, et al. Cyclooxygenase-2 Inhibitors in Human Skeletal Fracture Healing. *ORTHOPEDICS*. 1 de marzo de 2006;29(3).

286. Simon A, O'Connor J. Dose and Time-Dependent Effects of Cyclooxygenase-2 Inhibition on Fracture-Healing. *The Journal of Bone & Joint Surgery*. marzo de 2007;89(3):500-11.

287. Li C-J, Chang J-K, Wang G-J, Ho M-L. Constitutively expressed COX-2 in osteoblasts positively regulates Akt signal transduction via suppression of PTEN activity. *Bone*. 1 de febrero de 2011;48(2):286-97.

288. Romanò CL, Duci D, Romanò D, Mazza M, Meani E. Celecoxib versus indomethacin in the prevention of heterotopic ossification after total hip arthroplasty. *The Journal of Arthroplasty*. 1 de enero de 2004;19(1):14-8.

289. Saudan M, Saudan P, Perneger T, Riand N, Keller A, Hoffmeyer P. Celecoxib versus ibuprofen in the prevention of heterotopic ossification following total hip replacement. *The Journal of Bone and Joint Surgery British volume*. 1 de febrero de 2007;89-B(2):155-9.

290. Lane NE, Bauer DC, Nevitt MC, Pressman AR, Cummings SR. Aspirin and nonsteroidal antiinflammatory drug use in elderly women: effects on a marker of bone resorption. The Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *J Rheumatol*. junio de 1997;24(6):1132-6.

291. Morton DJ, Barrett-Connor EL, Schneider DL. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Bone Mineral Density in Older Women: The Rancho Bernardo Study. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1998;13(12):1924-31.

292. Beck A, Krischak G, Sorg T, Augat P, Farker K, Merkel U, et al. Influence of diclofenac (group of nonsteroidal anti-inflammatory drugs) on fracture healing. *Arch Orthop Trauma Surg*. 1 de septiembre de 2003;123(7):327-32.

293. Xie C, Ming X, Wang Q, Schwarz EM, Guldberg RE, O'Keefe RJ, et al. COX-2 from the injury milieu is critical for the initiation of periosteal progenitor cell mediated bone healing. *Bone*. 1 de diciembre de 2008;43(6):1075-83.

294. Díaz-Rodríguez L, García-Martínez O, De Luna-Bertos E, Ramos-Torrecillas J, Ruiz C. Effect of ibuprofen on proliferation, differentiation, antigenic expression, and phagocytic capacity of osteoblasts. *J Bone Miner Metab*. 1 de septiembre de 2012;30(5):554-60.

295. Armour KJ, Hof RJV 't, Armour KE, Torbergsen AC, Soldato PD, Ralston SH. Inhibition of bone resorption in vitro and prevention of ovariectomy-induced bone loss in vivo by flurbiprofen nitroxybutylester (HCT1026). *Arthritis & Rheumatism*. 2001;44(9):2185-92.

296. Honjo H, Kumagai Y, Ishiguro T, Imaizumi H, Ono T, Suzuki O, et al. Heterotopic Mesenteric Ossification After a Ruptured Abdominal Aortic Aneurism: Case Report With a

Review of Literatures. *Int Surg.* 2014;99(4):479-84.

297. Fessel J. There are many potential medical therapies for atraumatic osteonecrosis. *Rheumatology (Oxford)*. 1 de febrero de 2013;52(2):235-41.
298. Evans CE, Butcher C. The influence on human osteoblasts in vitro of non-steroidal anti-inflammatory drugs which act on different cyclooxygenase enzymes. *J Bone Joint Surg Br.* abril de 2004;86(3):444-9.
299. Chang J-K, Li C-J, Liao H-J, Wang C-K, Wang G-J, Ho M-L. Anti-inflammatory drugs suppress proliferation and induce apoptosis through altering expressions of cell cycle regulators and pro-apoptotic factors in cultured human osteoblasts. *Toxicology*. 28 de abril de 2009;258(2):148-56.
300. Díaz-Rodríguez L, García-Martínez O, Arroyo-Morales M, Rubio-Ruiz B, Ruiz C. Effect of acetaminophen (paracetamol) on human osteosarcoma cell line MG63. *Acta Pharmacologica Sinica*. noviembre de 2010;31(11):1495-9.
301. García-Martínez O, Díaz-Rodríguez L, Rodríguez-Pérez L, De Luna-Bertos E, Botella CR, Ruiz CC. Effect of acetaminophen, ibuprofen and methylprednisolone on different parameters of human osteoblast-like cells. *Archives of Oral Biology*. 1 de abril de 2011;56(4):317-23.
302. Luna-Bertos ED, Ramos-Torrecillas J, Manzano-Moreno FJ, García-Martínez O, Ruiz C. Effects on Growth of Human Osteoblast-Like Cells of Three Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Metamizole, Dexketoprofen, and Ketorolac. *Biological Research For Nursing*. 1 de enero de 2015;17(1):62-7.
303. Kaspar D, Hedrich CM, Schmidt C, Liedert A, Claes LE, Ignatius AA. [Diclofenac inhibits proliferation and matrix formation of osteoblast cells]. *Unfallchirurg*. enero de 2005;108(1):18, 20-4.
304. Krischak GD, Augat P, Blakytyn R, Claes L, Kinzl L, Beck A. The non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac reduces appearance of osteoblasts in bone defect healing in rats. *Arch Orthop Trauma Surg*. 1 de agosto de 2007;127(6):453-8.
305. Martinez L, Oliveira M, Miguel A, Rastelli V, Cruz J, Tostes R, et al. Losartan Attenuates the Antimigratory Effect of Diclofenac in Spontaneously Hypertensive Rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. agosto de 2005;46(2):190-9.
306. Matsumoto MA, De Oliveira A, Ribeiro Junior PD, Nary Filho H, Ribeiro DA. Short-term administration of non-selective and selective cox-2 nsais do not interfere with bone repair in rats. *J Mol Hist*. 1 de agosto de 2008;39(4):381-7.
307. De Luna-Bertos E, Ramos-Torrecillas J, García-Martínez O, Díaz-Rodríguez L, Ruiz C. Effect of Aspirin on Cell Growth of Human MG-63 Osteosarcoma Line. *The Scientific World Journal*. 2012;2012.
308. Coe LM, Denison JD, McCabe LR. Low Dose Aspirin Therapy Decreases Blood Glucose Levels but Does not Prevent Type I Diabetes-induced Bone Loss. *CPB*. 2011;28(5):923-32.
309. Zhang G sen, Tu C qing, Zhang G ying, Zhou G biao, Zheng W li. Indomethacin induces apoptosis and inhibits proliferation in chronic myeloid leukemia cells. *Leukemia Research*. 1 de mayo de 2000;24(5):385-92.
310. Chang J-K, Li C-J, Liao H-J, Wang C-K, Wang G-J, Ho M-L. Anti-inflammatory drugs

suppress proliferation and induce apoptosis through altering expressions of cell cycle regulators and pro-apoptotic factors in cultured human osteoblasts. *Toxicology*. 28 de abril de 2009;258(2):148-56.

311. Chang J-K, Li C-J, Wu S-C, Yeh C-H, Chen C-H, Fu Y-C, et al. Effects of anti-inflammatory drugs on proliferation, cytotoxicity and osteogenesis in bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochemical Pharmacology*. 1 de noviembre de 2007;74(9):1371-82.

312. Komori T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res*. 1 de agosto de 2009;339(1):189.

313. Oliveira PT de, Zalzal SF, Beloti MM, Rosa AL, Nanci A. Enhancement of in vitro osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2007;80A(3):554-64.

314. Bufan B, Mojsilović S, Vučićević D, Vučević D, Vasilijić S, Balint B, et al. Comparative effects of aspirin and NO-releasing aspirins on differentiation, maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells in vitro. *International Immunopharmacology*. 1 de julio de 2009;9(7):910-7.

315. Ing SW, Belury MA. Impact of conjugated linoleic acid on bone physiology: proposed mechanism involving inhibition of adipogenesis. *Nutr Rev*. 1 de marzo de 2011;69(3):123-31.

316. Vandrovcová M, Bačáková L. Adhesion, growth and differentiation of osteoblasts on surface-modified materials developed for bone implants. *Physiol Res*. 2011;60(3):403-17.

317. Nogueira GT, Mesquita-Ferrari RA, Souza NHC, Artilheiro PP, Albertini R, Bussadori SK, et al. Effect of low-level laser therapy on proliferation, differentiation, and adhesion of steroid-treated osteoblasts. *Lasers Med Sci*. 1 de noviembre de 2012;27(6):1189-93.

318. De Luna-Bertos E, Ramos-Torrecillas J, García-Martínez O, Guildford A, Santin M, Ruiz C. Therapeutic Doses of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Inhibit Osteosarcoma MG-63 Osteoblast-Like Cells Maturation, Viability, and Biomineralization Potential. *The Scientific World Journal*. 2013;2013.

319. Muñoz J, Navarro C, Noriega V, Pinaridi G, Sierralta F, Prieto JC, et al. Synergism between COX-3 inhibitors in two animal models of pain. *Inflammopharmacol*. 1 de abril de 2010;18(2):65-71.

320. Mousa SA. Cell Adhesion Molecules: Potential Therapeutic & Diagnostic Implications. *Mol Biotechnol*. 1 de enero de 2008;38(1):33-40.

321. Axelsson H, Lönnroth C, Andersson M, Lundholm K. Mechanisms behind COX-1 and COX-2 inhibition of tumor growth in vivo. *Int J Oncol*. noviembre de 2010;37(5):1143-52.

322. Villalonga N, David M, Bielańska J, González T, Parra D, Soler C, et al. Immunomodulatory effects of diclofenac in leukocytes through the targeting of Kv1.3 voltage-dependent potassium channels. *Biochemical Pharmacology*. 15 de septiembre de 2010;80(6):858-66.

323. Dubey AK, Tripathi G, Basu B. Characterization of hydroxyapatite-perovskite (CaTiO₃) composites: Phase evaluation and cellular response. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2010;95B(2):320-9.

324. Wu Y, Zitelli JP, TenHuisen KS, Yu X, Libera MR. Differential response of Staphylococci and osteoblasts to varying titanium surface roughness. *Biomaterials*. 1 de febrero de 2011;32(4):951-60.

JUSTIFICACIÓN

La literatura científica muestra, tanto en estudios realizados *in vivo* como *in vitro*, que los AINEs pueden ejercer su acción sobre el hueso y más concretamente sobre el osteoblasto, alterando diferentes parámetros a nivel tisular y celular. Este efecto depende fundamentalmente del tipo de AINE, de la dosis administrada y de la especie utilizada en el estudio. Si bien, hemos de señalar que los AINEs no selectivos de la COX han sido poco estudiados. Sin embargo, no hay consenso en relación al mecanismo por el que estos fármacos actúan sobre el hueso y/o sobre el osteoblasto. Por tanto, y a pesar de la evidencia disponible, es necesario el desarrollo de nuevos trabajos que permitan clarificar el mecanismo de acción de los AINEs sobre el osteoblasto, lo que nos permitirá comprender su efecto sobre el crecimiento, la diferenciación/maduración y la función de esta línea celular. Centrándonos principalmente en aquellos AINEs más utilizados tradicionalmente en la práctica clínica (diclofenaco, ibuprofeno, ketoprofeno, ketorolaco o naproxeno), en un analgésico (acetaminofén), así como un AINE selectivo de la COX-2 (celecoxib); se va a proceder al estudio del efecto de los mismos sobre distintos parámetros del osteoblasto.

HIPÓTESIS

Los AINEs, no selectivos de la COX, a dosis terapéuticas, son capaces de actuar modulando la expresión génica de distintos marcadores implicados en el crecimiento, en la diferenciación/maduración y en la función de las células osteoblásticas humanas en cultivo. Así mismo, el celecoxib, un AINE selectivo de la COX-2, *in vitro* puede ejercer su acción sobre distintos parámetros de los osteoblastos humanos.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar el efecto de distintos AINES, no selectivos (indometacina, ketoprofeno, diclofenaco, ibuprofeno, ketorolaco, naproxeno y piroxicam) y selectivos de la COX-2 (celecoxib), así como un analgésico (acetaminofén) sobre los osteoblastos humanos en cultivo.

Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de indometacina, ketoprofeno, diclofenaco, ibuprofeno, ketorolaco, naproxeno, piroxicam y acetaminofén, sobre la expresión génica de diferentes marcadores relacionados con el crecimiento, la diferenciación/maduración y función de los osteoblastos.
2. Estudiar el efecto de indometacina, ketoprofeno, diclofenaco, ibuprofeno, ketorolaco, naproxeno, piroxicam y acetaminofén, sobre en la expresión génica de VEGF, molécula implicada en la regeneración de tejidos, ~~en~~ sobre los osteoblastos humanos obtenidos por cultivos primarios y sobre las células osteoblásticas humanas de la línea MG63.
3. Analizar el efecto del celecoxib, un inhibidor selectivo de la COX-2, sobre diferentes parámetros celulares de los osteoblastos humanos en cultivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN/ RESULTS AND DISCUSSION

OBJETIVO 1:

Determinar el efecto de indometacina, ketoprofeno, diclofenaco, ibuprofeno, ketorolaco, naproxeno, piroxicam y acetaminofén, sobre la expresión génica de diferentes marcadores relacionados con el crecimiento, la diferenciación/maduración y función de los osteoblastos.



Repercussion of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the gene expression of human osteoblasts

Lucia Melguizo-Rodríguez^{1,2,*}, Víctor J. Costela-Ruiz^{1,*},
Francisco J. Manzano-Moreno^{2,3}, Rebeca Illescas-Montes^{2,4},
Javier Ramos-Torrecillas^{1,2}, Olga García-Martínez^{1,2} and Concepción Ruiz^{1,2,5}

¹Biomedical Group (BIO277), Department of Nursing, Faculty of Health Sciences, University of Granada, Granada, Spain

²Instituto Investigación Biosanitaria, ibs.Granada, University of Granada, Granada, Spain

³Biomedical Group (BIO277), Department of Stomatology, School of Dentistry, University of Granada, Granada, Spain

⁴Biomedical Group (BIO277), Department of Nursing, Faculty of Health Sciences, University of Granada, Melilla, Spain

⁵Institute of Neuroscience, University of Granada, Granada, Spain

*These authors contributed equally to this work.

ABSTRACT

Background. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are frequently used in clinical practice, which can have adverse effects on the osteoblast. The objective of this study was to determine the effect of NSAIDs on the osteoblast by analyzing the gene expression of different markers related to osteoblast maturation and function when treated *in vitro* with different NSAIDs.

Methods. Three human osteoblast lines from bone samples of three healthy volunteers were treated with 10 μ M acetaminophen, indomethacin, ketoprofen, diclofenac, ibuprofen, ketorolac, naproxen, and piroxicam. The gene expression of different markers (run related transcription factor 2 [*RUNX-2*], type 1 collagen [*COL-1*], osterix [*OSX*], osteocalcin [*OSC*], bone morphogenetic protein 2 [*BMP-2*] and 7 [*BMP-7*], transforming growth factor β 1 [*TGF- β 1*], and *TGF β* receptors [*TGF β R1*, *TGF β R2*; *TGF β R3*]) were analyzed by real-time PCR at 24 h of treatment.

Results. Expression of *RUNX-2*, *COL-1*, *OSX*, was reduced by treatment with all studied NSAIDs, *OSC* expression was reduced by all NSAIDs except for ketoprofen, naproxen, or piroxicam. Expression of *BMP-7* was reduced by all NSAIDs; *BMP-2* was reduced by all except for naproxen. In general, NSAID treatment increased the expression of *TGF- β 1*, but not of its receptors (*TGF β -R1*, *TGF β -R2*, and *TGF β -R3*), which was either unchanged or reduced by the treatment.

Conclusion. These data confirm that NSAIDs can affect osteoblast physiology, suggesting their possible impact on bone.

Submitted 7 March 2018

Accepted 20 July 2018

Published 14 August 2018

Corresponding author

Olga Garcia-Martínez, ogm@ugr.es

Academic editor

Giuseppe Nocentini

Additional Information and
Declarations can be found on
page 9

DOI 10.7717/peerj.5415

© Copyright

2018 Melguizo-Rodríguez et al.

Distributed under

Creative Commons CC-BY 4.0

OPEN ACCESS

Subjects Drugs and Devices, Pharmacology

Keywords Bone tissue, Osteoblasts, Differentiation, Gene expression, NSAIDs

INTRODUCTION

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) comprise a heterogeneous group of drugs, most of which are organic acids with anti-inflammatory, analgesic, antipyretic, and platelet antiaggregant actions. They are frequently used although various adverse gastrointestinal, renal, cardiovascular, or bone effects have been reported. ([Danelich et al., 2015](#); [García-Martínez et al., 2015](#); [Harirforoosh, Asghar & Jamali, 2013](#); [Nadanaciva et al., 2013](#); [Scarpignato & Hunt, 2010](#); [Vallano, Llop & Bosch, 2002](#)).

NSAIDs act by inhibiting cyclooxygenase (COX). However, the effect observed on bone tissue does not seem to be exclusively due to COX inhibition. Various studies have demonstrated that NSAIDs can interfere with bone formation and repair by cell cycle arrest in the G0/G1 phase of the osteoblast ([Chang et al., 2009](#); [Díaz-Rodríguez et al., 2010](#); [De Luna-Bertos et al., 2015](#)). This may explain the reduced bone density associated with NSAID consumption ([Van Staa, Leufkens & Cooper, 2000](#); [Beck et al., 2003](#); [Gerstenfeld et al., 2003](#); [Vuolteenaho, Moilanen & Moilanen, 2008](#); [Pountos et al., 2012](#)) and the *in vitro* growth inhibition shown by osteoblastic cells in the presence of these drugs ([Díaz-Rodríguez et al., 2010](#); [De Luna-Bertos et al., 2013](#); [Evans & Butcher, 2004](#); [Díaz-Rodríguez et al., 2012a](#); [Díaz-Rodríguez et al., 2012b](#); [García-Martínez et al., 2011](#)). These drugs also inhibit the maturation/differentiation of this cell population ([Díaz-Rodríguez et al., 2012a](#); [Díaz-Rodríguez et al., 2012b](#); [De Luna-Bertos et al., 2013](#)).

Osteoblasts play an essential role in bone physiology, participating in bone formation and remodeling and in the regeneration of damaged bone tissue ([Datta et al., 2008](#); [Long, 2011](#)). The maturation and function of this cell population are highly complex processes involving autocrine, paracrine, and endocrine factors ([Florencio-Silva et al., 2015](#)). The objective of this study was to analyze the possible effect of NSAIDs on the gene expression of different markers involved in osteoblast maturation/differentiation and function by using an *in vitro* experimental study, which may contribute to elucidate the mechanism underlying the action of NSAIDs on osteoblasts and therefore on bone.

MATERIAL AND METHODS

Osteoblast isolation and culture

Three cell lines of primary culture human osteoblasts were established by isolating, characterizing, and culturing osteoblasts from bone sections obtained (under signed informed consent) during mandibular surgery from three Caucasian patients (2 women and 1 man) aged between 20 and 30 yrs, following the procedure of [Manzano-Moreno et al. \(2013\)](#). This study was in accordance with the ethical standards of the ethical committee of the University of Granada (reference no. 721). The characterization of the cell lines was made based on alkaline phosphatase ([Fig. 1A](#)) and mineralization in osteogenic medium ([Fig. 1B](#)). We have analyzed the alkaline phosphatase activity following the indications of Kit Sigma alkaline phosphatase (Sigma, St Louis, MO, USA): Confluent cells of different lines established were fixed in citrate-acetone-formaldehyde solution at room temperature. Cells were exposed to naphthol AS-BI phosphate (Sigma, St Louis, MO, USA), which were used as the substrate for ALP activity. Hematoxylin staining was used to determine the

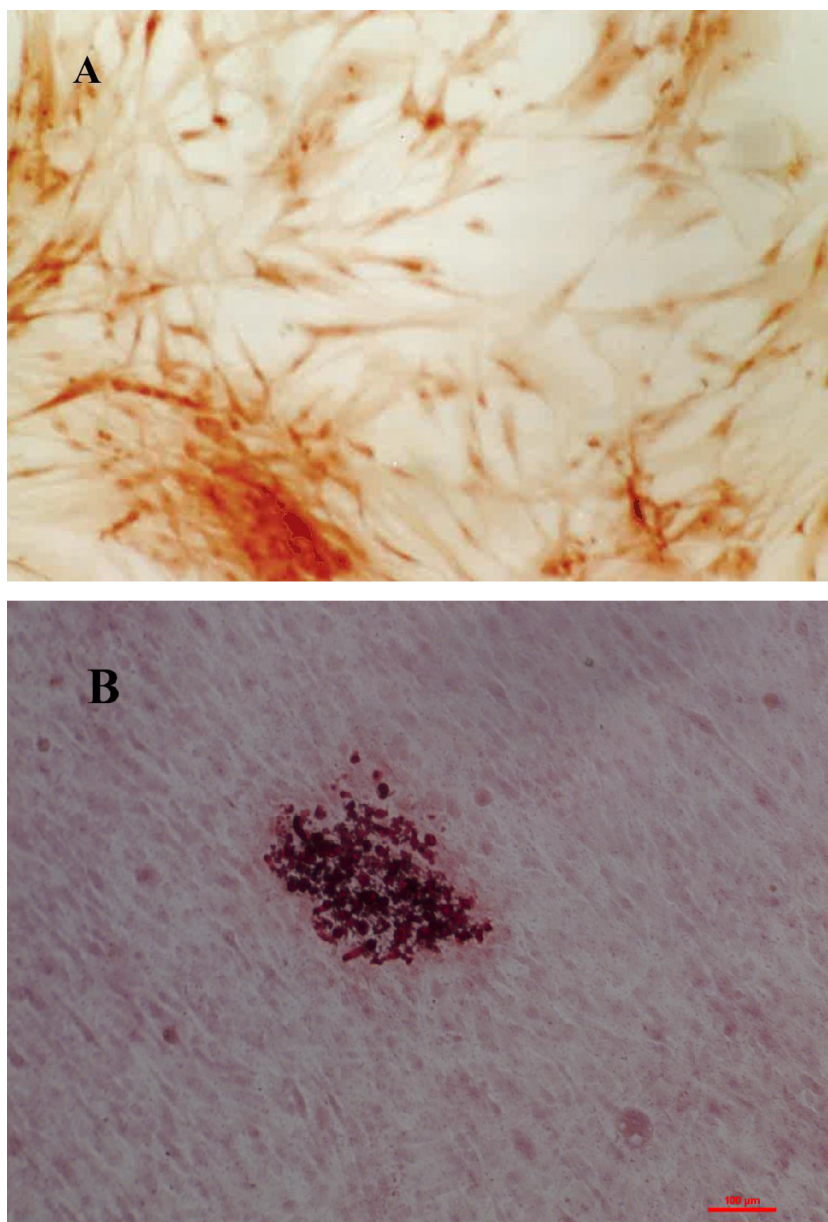


Figure 1 Characterization of the cell lines was made based on alkaline phosphatase activity, cells dyed in orange are positive for alkaline phosphatase activity (A) and mineralization in osteogenic medium, where it can be seen calcium nodes dyed in red color (B).

[Full-size](#)  DOI: [10.7717/peerj.5415/fig-1](https://doi.org/10.7717/peerj.5415/fig-1)

proportion of positive cells. For mineralization we have followed the method described by [Manzano-Moreno et al. \(2013\)](#): cells from the lines established from the two sample types were seeded (5×10^4 cells/ml/well) in a six-well plate (Falcon, Becton Dickinson Labware, St. Louis, MO, USA) and cultured in complete medium supplemented with 5 mM β -glycerophosphate and 0.05 mM ascorbic acid at 37 °C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂. The medium was replaced after 4 days and then every 3 days. We

examined the matrix mineralization of each cell line after 7, 15 and 22 days of culture. Red alizarin staining was used to visualize the precipitated calcium incorporated into the cellular matrix. Wells were washed with 150 mM sodium chloride, fixed in cold 70% ethanol for 5 min and rinsed three times with distilled water. Wells were then incubated for 10 min with 1 ml of a 2% red alizarin solution buffered at pH 4 with sodium hydroxide, then rinsed five times with distilled water and finally washed with PBS to reduce non-specific staining. Precipitate calcium present in the extracellular collagen matrix was colored red, revealing the mineralization nodules, which were counted under light microscopy.

Treatments

The osteoblast cell lines were treated for 24 h with acetaminophen, indomethacin, ketoprofen, diclofenac, ibuprofen, ketorolac, naproxen, or piroxicam (Sigma, St. Louis, MO, USA) at a dose of 10 μ M, untreated cells served as controls. Indomethacin, ketoprofen, diclofenac and piroxicam were previously dissolved with dimethyl Sulfoxide (DMSO) and diluted with culture medium, with a final concentration of DMSO of 0.001%.

Determination of the gene expression by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)

To determine the effect of NSAIDs and acetaminophen on the osteoblast gene expression we followed the methodology described by [Manzano-Moreno et al. \(2018\)](#). mRNA was extracted from the treated cells with a silicate gel technique in the Qiagen RNeasy extraction kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany). RNA was reverse-transcribed to cDNA and amplified by PCR using the iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA). mRNA of *RUNX2*, *OSX*, *OSC*, *COL-1*, *BMP-2*, *BMP-7*, *TGF- β 1*, *TGF- β -R1*, *TGF- β -R2*, and *TGF- β -R3* was detected with primers designed using NCBI-nucleotide library and Primer3-design as listed in [Table 1](#). Final results were normalized as described [Ragni et al. \(2013\)](#).

Quantitative RT-PCR (q-RT-PCR) was performed using the SsoFast™ EvaGreen® Supermix Kit (Bio-Rad laboratories) in accordance with the manufacturer's protocol.

Statistical analysis

SPSS 22.0 (IBM, Chicago, IL, USA) was used for data analyses. mRNA levels were expressed as means \pm SD. The Kolmogorov–Smirnov test was applied to evaluate the normality of variable distributions. ANOVA test and Bonferroni corrections were used for multiple comparisons. $p < 0.05$ was considered significant in all tests. Three cell lines of primary culture human osteoblasts were used for all experiments, and at least three experiments were performed for all assays.

RESULTS

Effect of NSAIDs on the expression of *RUNX-2*, *COL-1*, *OSX*, and *OSC* genes

Quantitative RT-PCR (q-RT-PCR) analysis was used to evaluate the expression of the osteoblast differentiation makers, *RUNX-2* ([Fig. 2A](#)), *OSX* ([Fig. 2B](#)), *COL-1* ([Fig. 2C](#)), and *OSC* ([Fig. 2D](#)). All genes expression decreased after 24 h of osteoblast treatment with each studied drugs except for *OSX* ([Fig. 1B](#)) which did not change with ibuprofen, and

Table 1 Primer sequences for the amplification of cDNA by real-time PCR.

Gene	Sense primer	Antisense primer	Amplicon (bp)
TGF- β 1	5'-TGAACCGGCCTTTCTGCTTCTCATG-3'	5'-GCGGAAGTCAATGTACAGCTGCCGC-3'	152
TGF- β R1	5'-ACTGGCAGCTGTCATTGCTGGACCAG-3'	5'-CTGAGCCAGAACCTGACGTTGTCATATCA-3'	201
TGF- β R2	5'-GGCTCAACCACCAGGGCATCCAGAT-3'	5'-CTCCCCGAGAGCCTGTCCAGATGCT-3'	139
TGF- β R3	5'-ACCGTGATGGGCATTGCGTTTGCA-3'	5'-GTGCTCTGCGTGCTGCCGATGCTGT-3'	173
RUNX-2	5'-TGGTTAATCTCCGCAGGTCAC-3'	5'-ACTGTGCTGAAGAGGCTGTTT-3'	143
OSX	5'-TGCCTAGAAGCCCTGAGAAA-3'	5'-TTTAACTTGGGGCCTTGAGA-3'	205
BMP-2	5'-TCGAAATTCCTCCGTGACCAG-3'	5'-CCACTTCCACCACGAATCCA-3'	142
BMP-7	5'-CTGGTCTTTGTCTGCAGTGG-3'	5'-GTACCCCTCAACAAGGCTTC-3'	202
COL-1	5'-AGAAGTGGTACATCAGCAAG-3'	5'-GAGTTTACAGGAAGCAGACA-3'	471
OSC	5'-CCATGAGAGCCCTCACACTCC-3'	5'-GGTCAGCCAACCTCGTCACAGTC-3'	258
UBC	5'-TGGGATGCAAATCTTCGTGAAGACCCTGAC-3'	5'-ACCAAGTGCAGAGTGGACTCTTTCTGGATG-3'	213
PPIA	5'-CCATGGCAAATGCTGGACCCAACACAAATG-3'	5'-TCCTGAGCTACAGAAGGAATGATCTGGTGG-3'	256
RPS13	5'-GGTGTGACACAAGTACGTTTTGTGACAGGC-3'	5'-TCATATTTCCAATTGGGAGGGAGGACTCGC-3'	251

OSC (Fig. 2D), whose expression was decreased after treatment with acetaminophen, indomethacin, diclofenac, ibuprofen, or ketorolac but it did not change after treatment with ketoprofen, naproxen or piroxicam.

Effect of NSAIDs on gene expression of *BMP-2* and *BMP-7*

Figure 2 and Table 1 depicts q-RT-PCR results for expression of the growth factors *BMP-2* and *BMP-7*. After 24 h of treatment at a dose of 10 μ M, osteoblast expression of *BMP-2* (Fig. 3A) and *BMP-7* (Fig. 3B) was significantly lower versus controls with all drugs assayed except for naproxen, which did not modify *BMP-2* expression.

Effect of NSAIDs on the gene expression of *TFG- β 1* and its receptors (*TFG- β R1*, *TFG- β R2*, and *TFG- β R3*)

Figure 3 depicts q-RT-PCR results for the gene expression of *TGF- β 1* and its receptors (*TGF- β R1*, *TGF- β R2*, and *TGF- β R3*). After 24 h of treatment at a dose of 10 μ M, osteoblast expression of *TGF- β 1* (Fig. 4A) expression was higher versus controls with all drugs assayed except for diclofenac, which produced a reduction in this expression and indomethacin that unchanged the expression. *TGF- β R1* (Fig. 4B) expression was decreased versus controls after treatment with each drug except for ibuprofen and naproxen, which did not affect this expression. *TGF- β R2* (Fig. 4C) expression was not changed by treatment with any NSAID except for indomethacin and ketoprofen, which significantly increased this expression. *TGF- β R3* (Fig. 4D) was also unchanged by treatment with any NSAID except for diclofenac, which significantly reduced this expression.

DISCUSSION

The results of this *in vitro* study of three osteoblast cell lines demonstrate that the expression of genes involved in osteoblast growth, maturation, and function can be modulated by treatment with acetaminophen, indomethacin, ketoprofen, diclofenac, ibuprofen,

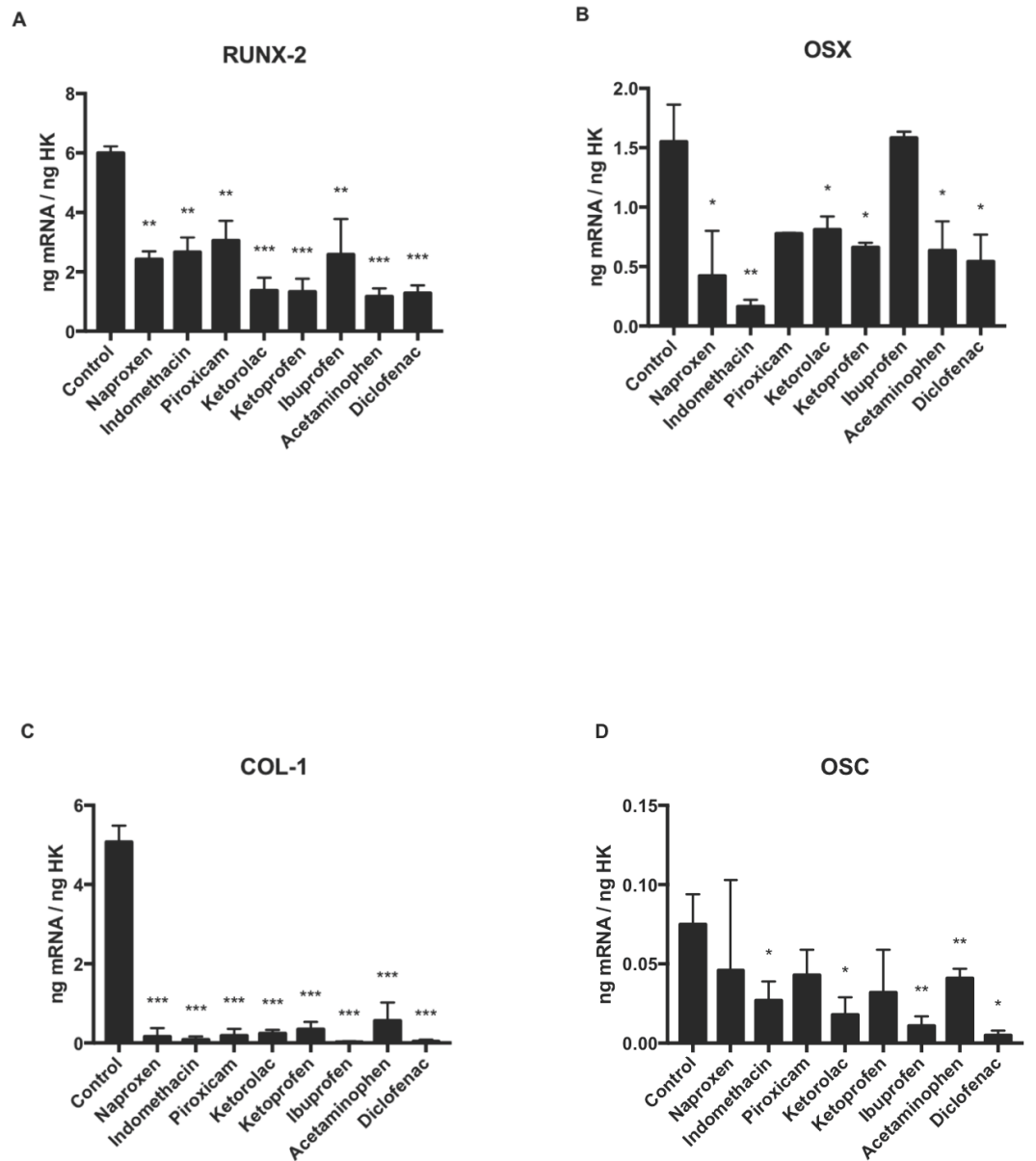


Figure 2 Expression of osteoblast differentiation genes treated for 24 h with acetaminophen, indomethacin, ketoprofen, diclofenac, ibuprofen, ketorolac, naproxen, or piroxicam (10 μ M). (A) RUNX-2, (B) OSX, (C) COL-1, (D) OSC. Data are expressed as means \pm SD of ng of mRNA per average ng of housekeeping mRNAs. * $p \leq 0.047$, ** $p \leq 0.007$, *** $p \leq 0.0001$.

Full-size DOI: 10.7717/peerj.5415/fig-2

ketorolac, naproxen, and piroxicam at a dose in the therapeutic range (Chang *et al.*, 2009; Buckley & Brogden, 1990). The dosage tested (10 μ M) was selected based on previous studies which showed that this therapeutic dose exerts an effect in osteoblast physiology without producing any kind of cytotoxicity (necrosis) on this cell population (Chang *et al.*, 2009; De Luna-Bertos *et al.*, 2015). Paracetamol is widely administered in clinical practice for its analgesic and antipyretic properties. It is not currently considered to be in the group

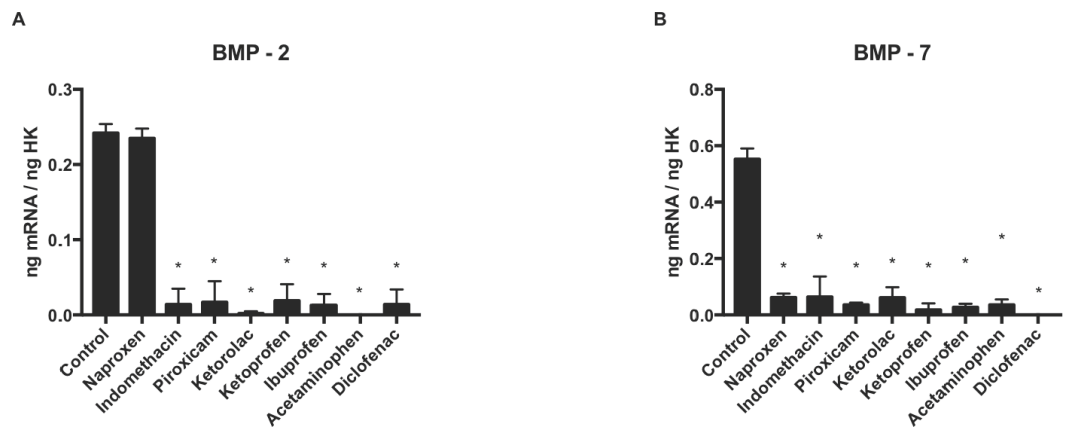


Figure 3 Expression of osteoblast genes treated for 24 h with acetaminophen, indomethacin, ketoprofen, diclofenac, ibuprofen, ketorolac, naproxen, or piroxicam (10 μ M). (A) BMP-2, (B) BMP-7. Data are expressed as ng of mRNA per average means \pm SD of ng of housekeeping mRNAs. * $p \leq 0.001$.

Full-size [DOI: 10.7717/peerj.5415/fig-3](https://doi.org/10.7717/peerj.5415/fig-3)

of NSAIDs but was included in our study because of its capacity for non-competitive reversible inhibition of the cyclooxygenase enzyme (Dawson *et al.*, 2005).

Most of these drugs inhibited the gene expression of *BMP-2* and *BMP-7*, which are important molecules for osteoblast growth and differentiation, while they increased the expression of *TGF- β 1* but not its receptors and reduced the expression of *RUNX-2*, *COL-1*, *OSX* and *OSC*, which are directly related to cell maturation. These data contribute to completing knowledge on the effect of NSAIDs on molecular, cellular, and functional parameters of osteoblasts (García-Martínez *et al.*, 2015; De Luna-Bertos *et al.*, 2015; De Luna-Bertos *et al.*, 2013) and further elucidate the mechanisms that underlie the effects of NSAIDs on these bone-forming cells.

Osteoprogenitors from the medulla differentiate and mature into pre-osteoblasts, osteoblasts, and osteocytes. Each stage of the functional differentiation of osteoblasts (proliferation, bone matrix synthesis, and mineralization) has been associated with specific cell markers (Long, 2011). In the present *in vitro* assays, markers related to each stage were modulated by NSAID treatment, suggesting changes in the differentiation and/or maturation of osteoblasts and therefore in their function.

The expression of *RUNX-2*, *OSX*, *COL-1*, and *OSC* genes was reduced in the human osteoblastic cell lines after treatment with all eight NSAIDs. Except *OSX* and *OSC* that did not change with ibuprofen and with ketoprofen, naproxen, or piroxicam, respectively. *RUNX-2* and *OSX* expressions are essential for osteoblast differentiation, with *RUNX-2* being more closely related to proliferation and *OSX* to the final maturation stage (Capulli, Paone & Rucci, 2014). *RUNX-2* is also involved in the expression of other genes related to osteoblast maturation, including *COL-1*, alkaline phosphatase (*ALP*), and *OSC* (Fakhry *et al.*, 2013). *COL-1* is associated with the proliferative stage, *ALP* with the differentiation stage, and *OSC* with the final maturation stage, which is characterized by the increased expression of *OSX* and *OSC* genes (Nakashima *et al.*, 2002; Glass *et al.*, 2005;

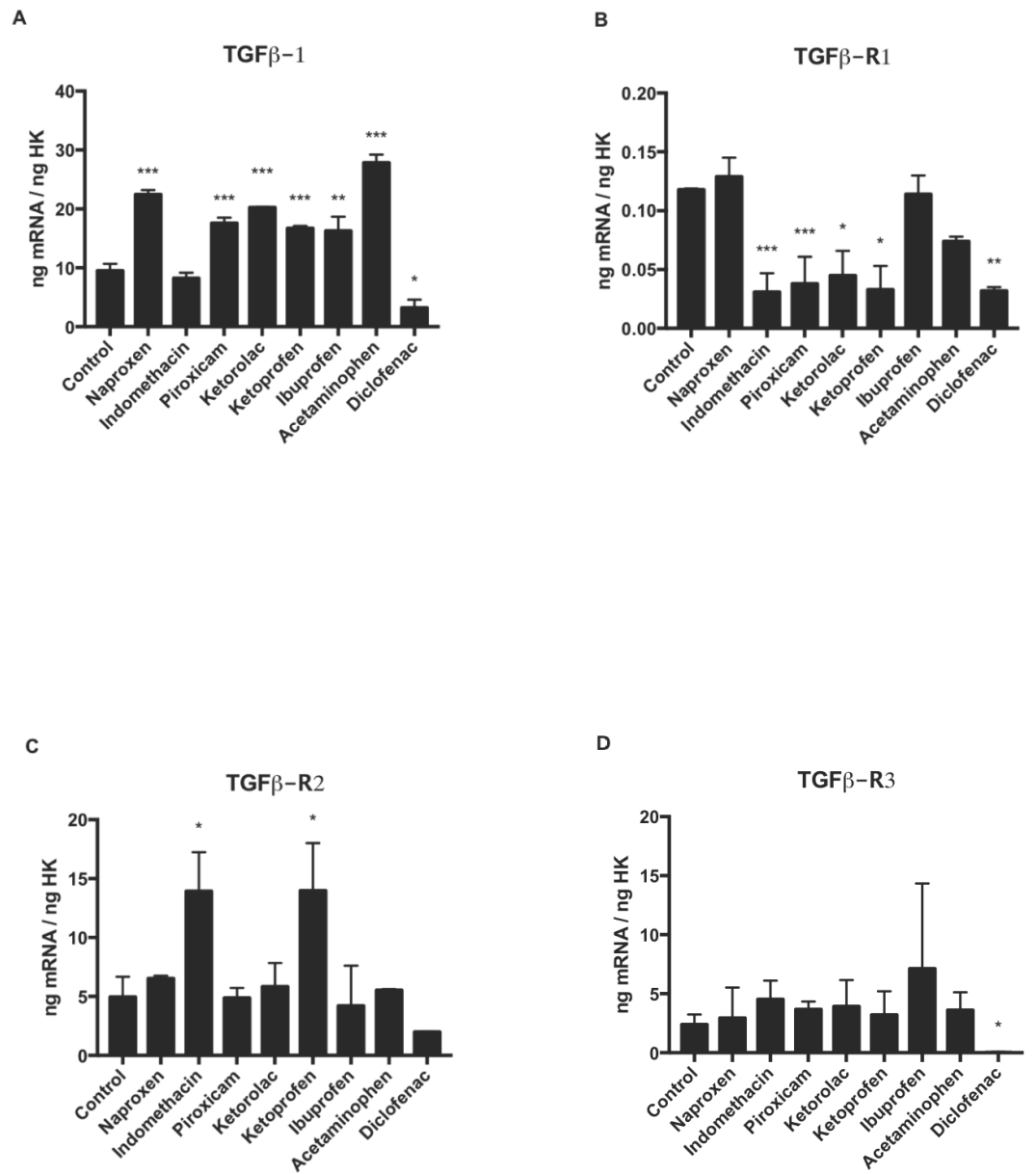


Figure 4 Expression of osteoblast genes treated for 24 h with acetaminophen, indomethacin, ketoprofen, diclofenac, ibuprofen, ketorolac, naproxen, or piroxicam (10 μ M). (A) TGF- β 1, (B) TGF β R1, (C) TGF β R2, (D) TGF β R3. Data are expressed as means \pm SD of ng of mRNA per average ng of housekeeping mRNAs. * $p \leq 0.032$, ** $p \leq 0.006$, *** $p \leq 0.001$.

Full-size DOI: [10.7717/peerj.5415/fig-4](https://doi.org/10.7717/peerj.5415/fig-4)

Hu et al., 2005). It should be borne in mind that the signaling relays in each stage are responsible for the final gene expression.

These observations of the inhibitory effects of NSAIDs on osteoblast differentiation and maturation are consistent with reports on the reduction in *ALP* or *OSC* synthesis and extracellular matrix mineralization in NSAID-treated osteoblastic cells

(Díaz-Rodríguez *et al.*, 2010; De Luna-Bertos *et al.*, 2015; Díaz-Rodríguez *et al.*, 2012a; Díaz-Rodríguez *et al.*, 2012b; Arpornmaeklong, Akarawatcharangura & Pripatnanont, 2008).

TGF-β1 and *BMP* signaling has a critical regulatory function in osteoblast differentiation and bone formation (Chen, Deng & Li, 2012; Rahman *et al.*, 2015), while members of the *BMP* family are also involved in regulating osteoblast lineage-specific differentiation and subsequent bone formation, inducing bone formation and being expressed during bone repair. *BMP-2* and *BMP-7* play a key role in osteoblast differentiation (Beederman *et al.*, 2013) and their involvement in bone formation has led to their clinical application (Bayat *et al.*, 2015; Seo *et al.*, 2015; Kelly, Vaughn & Anderson, 2016; Lin *et al.*, 2016). A major inhibition of *BMP-2* and *BMP-7* expression, implying the arrest of differentiation, was observed after treatment with all of the studied NSAIDs except for naproxen. In contrast, all of them except for diclofenac increased the expression of *TGF-β1* but not of its receptors, whose expression was either reduced or unchanged by the treatment, probably affecting the action of *TGF-β1*.

We have to highlight that results from this work has been obtained from three different cell lines, which would suppose a limitation.

CONCLUSIONS

According to the present *in vitro* study, NSAIDs and acetaminophen can modulate the expression of genes directly involved in osteoblast physiology, suggesting an inhibition of the maturation process that would directly affect bone tissue. Given the potential clinical repercussions of these findings, *in vivo* studies are warranted to verify and further explore the relationships found.

ADDITIONAL INFORMATION AND DECLARATIONS

Funding

This study was supported by research group BIO277 (Junta de Andalucía) and Department of Nursing (University of Granada). The work outlined in this article has been supported by the Spanish Ministry of Education under FPU fellowship reference FPU15-05635 and FPU16-04141. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Grant Disclosures

The following grant information was disclosed by the authors:
BIO277 (Junta de Andalucía).
Department of Nursing (University of Granada).
Spanish Ministry of Education: FPU15-05635, FPU16-04141.

Competing Interests

The authors declare there are no competing interests.

Author Contributions

- Lucia Melguizo-Rodríguez and Víctor J. Costela-Ruiz performed the experiments, analyzed the data, contributed reagents/materials/analysis tools, prepared figures and/or tables, authored or reviewed drafts of the paper, approved the final draft.
- Francisco J. Manzano-Moreno performed the experiments, analyzed the data, contributed reagents/materials/analysis tools, prepared figures and/or tables, approved the final draft.
- Rebeca Illescas-Montes and Javier Ramos-Torrecillas performed the experiments, contributed reagents/materials/analysis tools, approved the final draft.
- Olga García-Martínez and Concepción Ruiz conceived and designed the experiments, analyzed the data, authored or reviewed drafts of the paper, approved the final draft.

Human Ethics

The following information was supplied relating to ethical approvals (i.e., approving body and any reference numbers):

This study was in accordance with the ethical standards of the ethical committee of the University of Granada (reference no. 721).

Data Availability

The following information was supplied regarding data availability:

The raw data are provided in [Supplemental File](#).

Supplemental Information

Supplemental information for this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.5415#supplemental-information>.

REFERENCES

- Arpornmaeklong P, Akarawatcharangura B, Pripatnanont P. 2008.** Factors influencing effects of specific COX-2 inhibitor NSAIDs on growth and differentiation of mouse osteoblasts on titanium surfaces. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **23(6)**:1071–1081.
- Bayat M, Momen Heravi F, Mahmoudi M, Bahrami N. 2015.** Bone reconstruction following application of bone matrix gelatin to alveolar defects: a randomized clinical trial. *International Journal of Organ Transplantation Medicine* **6(4)**:176–181.
- Beck A, Krischak G, Sorg T, Augat P, Farker K, Merkel U, Kinzl L, Claes L. 2003.** Influence of diclofenac (group of nonsteroidal anti-inflammatory drugs) on fracture healing. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery* **123(7)**:327–332 DOI [10.1007/s00402-003-0537-5](https://doi.org/10.1007/s00402-003-0537-5).
- Beederman M, Lamplot JD, Nan G, Wang J, Liu X, Yin L, Li R, Shui W, Zhang H, Kim SH, Zhang W, Zhang J, Kong Y, Denduluri S, Rogers MR, Pratt A, Haydon RC, Luu HH, Angeles J, Shi LL, He TC. 2013.** BMP signaling in mesenchymal stem cell differentiation and bone formation. *Journal of Biomedical Science and Engineering* **6(8A)**:32–52 DOI [10.4236/jbise.2013.68A1004](https://doi.org/10.4236/jbise.2013.68A1004).

- Buckley MM, Brogden RN. 1990.** Ketorolac: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential. *Drugs* **39**(1):86–109 DOI [10.2165/00003495-199039010-00008](https://doi.org/10.2165/00003495-199039010-00008).
- Capulli M, Paone R, Rucci N. 2014.** Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **561**:3–12 DOI [10.1016/j.abb.2014.05.003](https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.05.003).
- Chang J-K, Li C-J, Liao H-J, Wang C-K, Wang G-J, Ho M-L. 2009.** Anti-inflammatory drugs suppress proliferation and induce apoptosis through altering expressions of cell cycle regulators and pro-apoptotic factors in cultured human osteoblasts. *Toxicology* **258**(2–3):148–156 DOI [10.1016/j.tox.2009.01.016](https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.01.016).
- Chen G, Deng C, Li Y-P. 2012.** TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *International Journal of Biological Sciences* **8**(2):272–288 DOI [10.7150/ijbs.2929](https://doi.org/10.7150/ijbs.2929).
- Danelich IM, Wright SS, Lose JM, Tefft BJ, Cicci JD, Reed BN. 2015.** Safety of non-steroidal antiinflammatory drugs in patients with cardiovascular disease. *Pharmacotherapy* **35**(5):520–535 DOI [10.1002/phar.1584](https://doi.org/10.1002/phar.1584).
- Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. 2008.** The cell biology of bone metabolism. *Journal of Clinical Pathology* **61**(5):577–587 DOI [10.1136/jcp.2007.048868](https://doi.org/10.1136/jcp.2007.048868).
- Dawson JS, Moreno González A, Taylor MNF, Reide PJW. 2005.** *Lo esencial en farmacología*. Madrid: Elsevier.
- De Luna-Bertos E, Ramos-Torrecillas J, García-Martínez O, Guildford A, Santin M, Ruiz C. 2013.** Therapeutic doses of nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit osteosarcoma MG-63 osteoblast-like cells maturation, viability, and biomineralization potential. *Scientific World Journal* **2013**:Article 809891 DOI [10.1155/2013/809891](https://doi.org/10.1155/2013/809891).
- De Luna-Bertos E, Ramos-Torrecillas J, Manzano-Moreno FJ, García-Martínez O, Ruiz C. 2015.** Effects on growth of human osteoblast-like cells of three nonsteroidal anti-inflammatory drugs: metamizole, dexketoprofen, and ketorolac. *Biological Research For Nursing* **17**(1):62–67 DOI [10.1177/1099800414527155](https://doi.org/10.1177/1099800414527155).
- Díaz-Rodríguez L, García-Martínez O, Arroyo-Morales M, Rubio-Ruiz B, Ruiz C. 2010.** Effect of acetaminophen (paracetamol) on human osteosarcoma cell line MG63. *Acta Pharmacologica Sinica* **31**(11):1495–1499 DOI [10.1038/aps.2010.129](https://doi.org/10.1038/aps.2010.129).
- Díaz-Rodríguez L, García-Martínez O, De Luna-Bertos E, Ramos-Torrecillas J, Ruiz C. 2012a.** Effect of ibuprofen on proliferation, differentiation, antigenic expression, and phagocytic capacity of osteoblasts. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* **30**(5):554–560 DOI [10.1007/s00774-012-0356-2](https://doi.org/10.1007/s00774-012-0356-2).
- Díaz-Rodríguez L, García-Martínez O, Morales MA, Rodríguez-Pérez L, Rubio-Ruiz B, Ruiz C. 2012b.** Effects of indomethacin nimesulide and diclofenac on human MG-63 osteosarcoma cell line. *Biological Research For Nursing* **14**(1):98–107 DOI [10.1177/1099800411398933](https://doi.org/10.1177/1099800411398933).
- Evans CE, Butcher C. 2004.** The influence on human osteoblasts *in vitro* of non-steroidal anti-inflammatory drugs which act on different cyclooxygenase enzymes. *Journal of Bone and Joint Surgery* **86**(3):444–449.

- Fakhry M, Hamade E, Badran B, Buchet R, Magne D. 2013.** Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. *World Journal of Stem Cells* 5(4):136–148 DOI 10.4252/wjsc.v5.i4.136.
- Florencio-Silva R, Da S Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. 2015.** Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *BioMed Research International* 2015:Article 421746 DOI 10.1155/2015/421746.
- García-Martínez O, De Luna-Bertos E, Ramos-Torrecillas J, Manzano-Moreno FJ, Ruiz C. 2015.** Repercussions of NSAIDs drugs on bone tissue: the osteoblast. *Life Sciences* 123:72–77 DOI 10.1016/j.lfs.2015.01.009.
- García-Martínez O, Díaz-Rodríguez L, Rodríguez-Pérez L, De Luna-Bertos E, Reyes Botella C, Ruiz C. 2011.** Effect of acetaminophen ibuprofen and methylprednisolone on different parameters of human osteoblast-like cells. *Archives of Oral Biology* 56(4):317–323 DOI 10.1016/j.archoralbio.2010.10.018.
- Gerstenfeld LC, Thiede M, Seibert K, Mielke C, Phippard D, Svagr B, Cullinane D, Einhorn TA. 2003.** Differential inhibition of fracture healing by non-selective and cyclooxygenase-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Journal of Orthopaedic Research* 21(4):670–675 DOI 10.1016/S0736-0266(03)00003-2.
- Glass DA, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, Taketo MM, Long F, McMahan AP, Lang RA, Karsenty G. 2005.** Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Developmental Cell* 8(5):751–764 DOI 10.1016/j.devcel.2005.02.017.
- Harirforoosh S, Asghar W, Jamali F. 2013.** Adverse effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 16(5):821–847.
- Hu H, Hilton MJ, Tu X, Yu K, Ornitz DM, Long F. 2005.** Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *Development* 132(1):49–60 DOI 10.1242/dev.01564.
- Kelly MP, Vaughn OLA, Anderson PA. 2016.** Systematic review and meta-analysis of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in localized alveolar ridge and maxillary sinus augmentation. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 74(5):928–939 DOI 10.1016/j.joms.2015.11.027.
- Lin G-H, Lim G, Chan H-L, Giannobile WV, Wang H-L. 2016.** Recombinant human bone morphogenetic protein 2 outcomes for maxillary sinus floor augmentation: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Oral Implants Research* 27(11):1349–1359 DOI 10.1111/cr.12737.
- Long F. 2011.** Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13(1):27–38 DOI 10.1038/nrm3254.
- Manzano-Moreno FJ, Ramos-Torrecillas J, Melguizo-Rodríguez L, Illescas-Montes R, Ruiz C, García-Martínez O. 2018.** Bisphosphonate modulation of the gene expression of different markers involved in osteoblast physiology: possible implications in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *International Journal of Medical Sciences* 15(4):359–367 DOI 10.7150/ijms.22627.

- Manzano-Moreno FJ, Rodríguez-Martínez JB, Ramos-Torrecillas J, Vallecillo-Capilla MF, Ruiz C, García-Martínez O, Reyes-Botella C. 2013.** Proliferation and osteogenic differentiation of osteoblast-like cells obtained from two techniques for harvesting intraoral bone grafts. *Clinical Oral Investigations* 17(5):1349–1356 DOI 10.1007/s00784-012-0811-4.
- Nadanaciva S, Aleo MD, Strock CJ, Stedman DB, Wang H, Will Y. 2013.** Toxicity assessments of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in isolated mitochondria, rat hepatocytes, and zebrafish show good concordance across chemical classes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 272(2):272–280 DOI 10.1016/j.taap.2013.06.019.
- Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, De Crombrughe B. 2002.** The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108(1):17–29 DOI 10.1016/S0092-8674(01)00622-5.
- Pountos I, Georgouli T, Calori GM, Giannoudis PV. 2012.** Do Nonsteroidal anti-inflammatory drugs affect bone healing? A critical analysis. *The Scientific World Journal* 2012:Article 606404 DOI 10.1100/2012/606404.
- Ragni E, Viganò M, Rebullà P, Giordano R, Lazzari L. 2013.** What is beyond a qRT-PCR study on mesenchymal stem cell differentiation properties: how to choose the most reliable housekeeping genes. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 17(1):168–180 DOI 10.1111/j.1582-4934.2012.01660.x.
- Rahman MS, Akhtar N, Jamil HM, Banik RS, Asaduzzaman SM. 2015.** TGF- β /BMP signaling and other molecular events: regulation of osteoblastogenesis and bone formation. *Bone Research* 3:Article 15005 DOI 10.1038/boneres.2015.5.
- Scarpignato C, Hunt RH. 2010.** Nonsteroidal antiinflammatory drug-related injury to the gastrointestinal tract: clinical picture, pathogenesis, and prevention. *Gastroenterology Clinics of North America* 39(3):433–464 DOI 10.1016/j.gtc.2010.08.010.
- Seo S-J, Bark CW, Lim J-H, Kim Y-G. 2015.** Bone dynamics in the upward direction after a maxillary sinus floor elevation procedure: serial segmentation using synchrotron radiation micro-computed tomography. *International Journal of Nanomedicine* 10(Spec. Iss.):129–136 DOI 10.2147/IJN.S88282.
- Vallano A, Llop R, Bosch M. 2002.** Beneficios y riesgos de los antiinflamatorios no esteroideos inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa-2. *Med Clínica*. 119(11):429–434.
- Van Staa TP, Leufkens HG, Cooper C. 2000.** Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of fractures. *Bone* 27(4):563–568 DOI 10.1016/S8756-3282(00)00361-6.
- Vuolteenaho K, Moilanen T, Moilanen E. 2008.** Non-steroidal anti-inflammatory drugs, cyclooxygenase-2 and the bone healing process. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 102(1):10–14 DOI 10.1111/j.1742-7843.2007.00149.x.

OBJETIVO 2:

Estudiar el efecto de indometacina, ketoprofeno, diclofenaco, ibuprofeno, ketorolaco, naproxeno, piroxicam y acetaminofén, sobre en la expresión génica de VEGF, molécula implicada en la regeneración de tejidos, ~~en~~ sobre los osteoblastos humanos obtenidos por cultivos primarios y sobre las células osteoblásticas humanas de la línea MG63.



Inhibition of VEGF gene expression in osteoblast cells by different NSAIDs

Francisco Javier Manzano-Moreno^{a,b,1}, Víctor Javier Costela-Ruiz^{c,1},
Lucía Melguizo-Rodríguez^{b,c}, Rebeca Illescas-Montes^{b,d}, Olga García-Martínez^{b,c},
Concepción Ruiz^{b,c,e,*}, Javier Ramos-Torrecillas^{b,c}

^a Biomedical Group (BIO277), Department of Stomatology, School of Dentistry, University of Granada, Spain

^b Instituto Investigación Biosanitaria, ibs. Granada, Spain

^c Biomedical Group (BIO277), Department of Nursing, Faculty of Health Sciences, University of Granada, Spain

^d Biomedical Group (BIO277), Department of Nursing, Faculty of Health Sciences, Melilla, University of Granada, Spain

^e Institute of Neuroscience, Parque Tecnológico Ciencias de la Salud, Armilla, Granada, University of Granada, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Osteoblast
NSAIDs
VEGF
Gene expression
PCR

ABSTRACT

Objective: To determine the effect of different nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on vascular endothelial growth factor (VEGF) gene expression in two osteoblast cell populations.

Design: Osteoblasts obtained by primary culture (HOp) and human osteosarcoma cell line MG63 (MG-63), which were treated with 10 μM doses of acetaminophen, indomethacin, ketoprofen, diclofenac, ibuprofen, ketorolac, naproxen or piroxicam. At 24 h of treatment, their gene expression of VEGF was evaluated by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) and compared with the expression in untreated cells (control group).

Results: The treatment with the different NSAIDs significantly reduced VEGF expression regardless of the cell line and NSAID studied.

Conclusion: The results of this study suggest that these drugs may have undesirable effects on the osteoblast and its bone-forming capacity, given the effect of this growth factor on these cells. Further studies are warranted to determine their repercussions on bone tissue and to elucidate the cell signaling mechanism/s involved.

1. Introduction

Osteoblast lineage cells, which derive from mesenchymal stem cells, are an important potential target for bone anabolic agents. Osteoblasts synthesize bone matrix for bone formation and play crucial roles in mineral metabolism, hematopoiesis, and bone resorption (Datta, Ng, Walker, Tuck, & Varanasi, 2008). They therefore exert an important function in bone remodeling and regeneration and in all clinical situations requiring new bone tissue formation, including fractures or surgery affecting bone (Berendsen & Olsen, 2015). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) administration is frequent in these clinical situations due to their analgesic and anti-inflammatory action. However, NSAIDs can have undesirable effects on osteoblasts by altering their physiology (García-Martínez, De Luna-Bertos, Ramos-Torrecillas, Manzano-Moreno, & Ruiz, 2015). Potential effects of NSAIDs on osteoblasts include a reduction in their growth by apoptosis induction or differentiation inhibition (Chang et al., 2009; De Luna-Bertos et al., 2013; De Luna-Bertos, Ramos-Torrecillas, Manzano-Moreno, García-Martínez, & Ruiz, 2015; Díaz-Rodríguez, García-

Martínez, Morales et al., 2012; Díaz-Rodríguez, García-Martínez, Arroyo-Morales, Rubio-Ruiz, & Ruiz, 2010; Díaz-Rodríguez, García-Martínez, De Luna-Bertos et al., 2012).

Bone is a highly vascularized tissue, which involves a high degree of communication between blood vessel cells and bone cells in different stages, e.g., bone formation or development, fracture healing, or bone regeneration (Clarkin & Gerstenfeld, 2013). Osteoblasts are the main source of angiogenic factors, such as the vascular endothelial growth factor (VEGF) (Hu & Olsen, 2016), and the blood vessels formed can provide the oxygen, nutrients, minerals, and different factors secreted (even by the osteoblast itself), which are required for bone formation (Kusumbe, Ramasamy, & Adams, 2014). VEGFs also have a key role in bone remodeling by activating the synthesis of receptor activator NK-κB ligand/osteoprotegerin (RANKL/OPG), molecules involved in osteoclast activation (Hu & Olsen, 2016; Huang, Ma, & Kyrkanides, 2016).

The objective of the present study was to analyze the possible effect of different NSAIDs (acetaminophen, indomethacin, ketoprofen, diclofenac, ibuprofen, ketorolac, naproxen, and piroxicam) on VEGF gene expression in two osteoblast cell populations: human osteoblasts

* Corresponding author at: Faculty of Health Sciences, University of Granada, Avda. De la Ilustración s/n, 18016, Granada, Spain.

E-mail address: crr@ugr.es (C. Ruiz).

¹ These authors contributed equally to this study.

Table 1
Primer sequences for the amplification of cDNA by real-time PCR.

Gene	Sense Primer	Antisense Primer	Amplicon (bp)
VEGF	5'-CCTTGCTGCTCTACCTCCAC-3'	5'-CACACAGGATGGCTTGAAGA-3'	197
UBC	5'-TGGGATGCAAATCTTCGTGAAGACCCCTGAC-3'	5'-ACCAAGTGACAGAGTGGACTCTTCTGGATG-3'	213
PPIA	5'-CCATGGCAAATGCTGGACCCAACAAATG-3'	5'-TCCTGAGCTACAGAAGGAATGATCTGGTGG-3'	256
RPS13	5'-GGTGTTCACAAGTACGTTTTGTGACAGGC-3'	5'-TCATATTTCCAATTGGGAGGGAGGACTCGC-3'	251

obtained by primary culture (HOp) and the MG63 osteoblast line.

2. Methods

2.1. Isolation and culture of HOp

Single samples of trabecular bone section from three Caucasian patients (2 females, 1 male) between 20–30 years of age were independently processed. Sections were washed thoroughly in phosphate-buffered saline solution (PBS, pH 7.4) to remove marrow and were seeded onto culture dishes (Falcon Labware, Oxford, UK) 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 20% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Paisley, UK). Cultures were kept at 37 °C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂. Confluent monolayers were obtained after 3–6 weeks. As a result, three highly pure osteoblastic lines were obtained (one from each patient). Cells were characterized by their morphological, biochemical (alkaline phosphatase activity and osteocalcin secretion), and antigenic profile (CD10+, CD13+ and CD44+) as described by Lucena et al (Lucena et al., 2013).

2.2. Ethical approval

All procedures performed in this study involving human participants were in accordance with the ethical standards of the ethical committee of the University of Granada (reference no. 721) and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

2.3. MG63 cell line

Human MG63 osteosarcoma cell line was purchased from American Type Cultures Collection (ATCC, Manassas, VA) and maintained in DMEM (Gibco) with 100 IU/mL penicillin (Lab Roger SA), 50 µg/mL gentamicin (Braun Medical SA), 2.5 µg/mL amphotericin B (Sigma), 1% glutamine (Sigma), and 2% HEPES (Sigma) supplemented with 10% FBS (Gibco). 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) and 0.02% ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) (Sigma) and were then washed and suspended in complete culture medium with 10% FBS. MG63 cells are widely used as osteoblast model because they share similar characteristics.

For subculture, HOp or MG63 cell lines were detached from the culture flask with a solution of 0.05% trypsin (Sigma) and 0.02% EDTA (Sigma) and then washed and suspended in complete culture medium with 20% or 10% FBS respectively.

2.4. Treatment

Cells (HOp and MG63) were seeded at 1×10^4 cells/mL per well into a 24-well plate (Falcon, Becton Dickinson Labware, NJ) and cultured at 37 °C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂ for

24 h. Next, the medium was replaced with DMEM containing acetaminophen, indomethacin, ketoprofen, diclofenac, ibuprofen, ketorolac, naproxen, or piroxicam, all purchased from Sigma, at a dose of 10 µM, or were untreated as controls, during 24 h. Indomethacin, ketoprofen, diclofenac and piroxicam were previously dissolved with dimethyl Sulfoxide (DMSO) and diluted with culture medium, with a final concentration of DMSO of 0.001%.

2.5. RNA extraction and cDNA synthesis (reverse transcription)

At 24 h of culture after NSAID treatment (using untreated cells as controls), cells were detached from the culture flask by treatment with 0.05% trypsin-EDTA solution (Sigma) and individually harvested. mRNA was extracted using a silicate gel technique provided by the Qiagen RNeasy extraction kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany), which included 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 of total RNA in 40 µL of total volume) was reverse-transcribed to cDNA and amplified by PCR with iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA) according to the manufacturer's protocol.

2.6. Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)

In order to detect VEGF, primers (Table 1) were designed using NCBI-nucleotide library and Primer3-design. The primer had been matched to the mRNA sequences of the target genes (NCBI Blast software). Ubiquitin C (UBC), peptidylprolyl isomerase A (PPIA), and ribosomal protein S13 (RPS13) were evaluated as stable housekeeping genes to normalize the final results (Ragni, Viganò, Rebullà, Giordano, & Lazzari, 2013).

Quantitative RT-PCR (q-RT-PCR) was performed with EvaGreen® technology using the SsoFast™ EvaGreen® Supermix Kit (Bio-Rad laboratories) and following the manufacturer's protocol. Samples were amplified in 96-well microplates in an IQ5-Cycler (Bio-Rad laboratories) using an annealing temperature (specific for each gene) ranging from 60 °C to 65 °C and an elongation temperature of 72 °C over 40 cycles. PCR reactions were carried out in a final volume of 20 µL, with 5 µL of cDNA sample and 2 µL of each primer. For the negative control, water was used instead of mRNA-samples. Standard curves were constructed for each target gene by plotting Ct values against log cDNA dilution. After each RT-PCR, a melting profile was created and agarose gel electrophoresis of each sample was carried out to rule out non-specific PCR products and primer dimers. The relative quantification of gene expression was determined using the comparative Ct method. For each gene, the mRNA concentration was expressed in ng of mRNA per average ng of housekeeping mRNAs. The cDNA from individual cell experiments was analyzed in triplicate RT-PCR studies.

2.7. Statistical analysis

SPSS 22.0 (IBM, Chicago, IL) was used for all data analyses. mRNA levels were expressed as means ± standard deviation (SD). Comparisons were made with a two-tailed unpaired Student's *t*-test $P \leq 0.05$ was considered statistically significant in all tests. At least

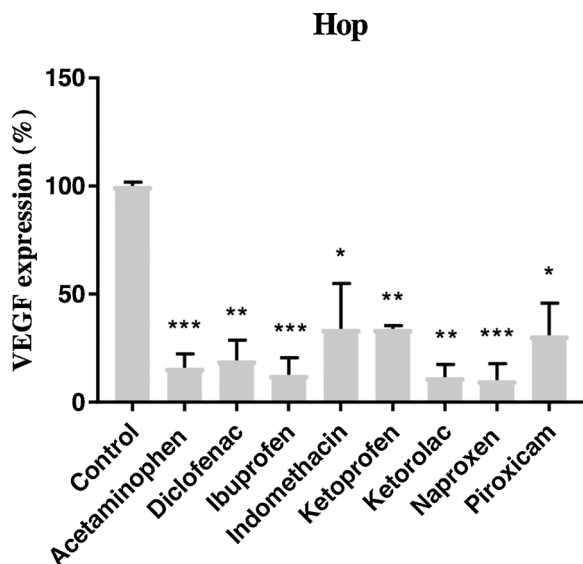


Fig. 1. Expression of VEGF gene in HOp osteoblasts treated for 24 h with acetaminophen, indomethacin, ketoprofen, diclofenac, ibuprofen, ketorolac, naproxen, or piroxicam (10 μ M). Data are expressed as percentage of expression with respect the control \pm SD. *** $P \leq 0.008$, ** $P \leq 0.025$, * $P \leq 0.047$.

three experiments were performed in all assays.

3. Results

Quantitative RT-PCR (q-RT-PCR) analysis was used to evaluate the expression of VEGF. As depicted in Figs. 1 and 2, treatment with the NSAIDs for 24 h significantly decreased the expression of VEGF gene ($P \leq 0.001$) in both cell lines studied (HOp or MG63). The VEGF expression effect was more marked in the HOp line as result of treatment with the different NSAIDs, with a decrease ranging between 90 and 66% with respect to controls.

4. Discussion

Our results show that the NSAIDs under study (acetaminophen,

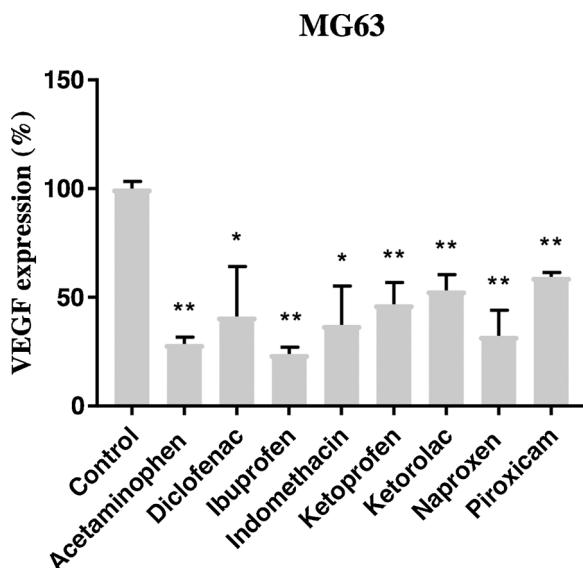


Fig. 2. Expression of VEGF genes in MG63 cell line treated for 24 h with acetaminophen, indomethacin, ketoprofen, diclofenac, ibuprofen, ketorolac, naproxen, or piroxicam (10 μ M). Data are expressed as percentage of expression with respect the control \pm SD. ** $P \leq 0.001$, * $P \leq 0.023$.

indomethacin, ketoprofen, diclofenac, ibuprofen, ketorolac, naproxen, and piroxicam) can all inhibit expression of the gene that encodes VEGF, which is involved in the growth and maturation of osteoblasts and the regeneration of bone tissue. The dosage tested (10 μ M) was selected based on previous studies which showed that this therapeutic dose exerts an effect in osteoblast physiology without producing any kind of cytotoxicity (necrosis) on this cell population (Chang et al., 2009; De Luna-Bertos et al., 2015).

NSAIDs used in this study are nonselective COX inhibitors. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and cyclooxygenase-2 (COX 2) are markers of angiogenesis and they are closely related (Whynott, Manahan, & Geisler, 2016). In addition, previous studies showed that the suppression of prostaglandin synthesis reduces the expression of VEGF-mRNA in murine osteoblasts (RCT-3 cells). PGE1 and PGE2 are potent stimulators of bone formation and it is strongly dependent on angiogenesis (Harada, Rodan, & Rodan, 1995).

This effect was more marked on the HOp line, which had a higher degree of maturation. Previous studies have showed that the expression of certain markers of the osteoblast, such as CD54, could be modified in relation to its differentiation/maturation (Lisignoli et al., 2004; Stanley, VanDort, Motyl, Endres, & Fox, 2006). Díaz-Rodríguez, García-Martínez, Arroyo-Morales, Reyes-Botella, and Ruiz, 2009 demonstrated that 100% of MG63 cell line express this marker.

Osteoblast differentiation and maturation is a complex process, modulated by exogenous mechanical or nutritional factors and regulated by endogenous factors, such as hormones, cytokines, and growth factors (Ikeda & Takeshita, 2014). The different growth factors that favor osteoblast growth and maturation include transforming growth factor- β (TGF β), fibroblast growth factor (FGF), and VEGF, among others (Berendsen & Olsen, 2015; Kronenberg, 2003). TGF β 1 acts during the proliferative phase of the osteoblast, stimulating cell growth, and also intervenes during the late phase, favoring osteoblast differentiation or maturation (Chen, Deng, & Li, 2012; Kasagi & Chen, 2013). FGF is a matrix-embedded cytokine reported to be involved in bone formation regulation and the balance between formation and resorption (Ornitz & Marie, 2015) as well as in cell migration (Song et al., 2016) and angiogenesis (Esser et al., 2015). VEGF is the main angiogenic agent, due to its potent mitogenic effect on vascular endothelial cells, inducing their proliferation (Clarkin & Gerstenfeld, 2013), and has been attributed an essential role in tissue regeneration processes in general (Coults, Chawengsaksophak, & Rossant, 2005). Osteoblasts are one of the cell populations capable of synthesizing this growth factor; however, this synthesis takes place in response to certain physiological stimuli, e.g., the presence of TGF β 1 (Zuo et al., 2012). The VEGF secreted from osteoblasts is considered to promote bone formation by supplying the angiogenic response to osteoblast activity (Zelzer & Olsen, 2005). The TGF- β released by osteoblasts during bone resorption stimulates VEGF synthesis, which contributes to appropriate bone remodeling, essential to maintain bone mass and quality (Zuo et al., 2012). The stimulus originated by TGF- β has an immediate effect on the expression of hundreds of genes, mainly using Smad transcription factors as signaling pathway. There are eight Smad proteins in the human genome, and activation by TGF- β 1 involves Smad2 and Smad3 proteins (Loboda, Sobczak, Jozkowicz, & Dulak, 2016).

Yamamoto et al. (2015) reported that Smad3 is the predominant pathway for TGF- β -stimulated VEGF synthesis in osteoblasts, while Rac inhibition was found to improve VEGF synthesis by a Smad-independent pathway. These authors suggested that Rac might have a role in bone remodeling regulation as a modulator of VEGF synthesis in osteoblasts. Indeed, they proposed that the regulation of Rac activity in osteoblasts might offer a novel therapeutic approach to the treatment of metabolic bone diseases such as osteoporosis.

It is possible that the inhibition of VEGF expression shown by osteoblasts treated with the different NSAIDs is a consequence of its effect on TGF β . It would be interesting to determine the effect of NSAIDs on the expression / synthesis of different autocrine growth factors,

especially TGF β , given the role that this growth factor has on osteoblast physiology, specially on osteoblast proliferation and differentiation. In addition, further studies are needed to determine the effect of selective COX-2 inhibitors on VEGF gene expression and other parameters in osteoblasts.

5. Conclusion

The present results indicate a previously unreported adverse effect of NSAIDs on bone physiology. Further research is warranted to determine the action mechanism underlying their inhibition of VEGF expression in osteoblasts, given the crucial importance of this growth factor in bone tissue.

Disclosure

The authors declare that they have no conflict of interest. All authors have approved the final article.

Acknowledgment

This study was supported by the research group BIO277 (Junta de Andalucía) and Department of Nursing (University of Granada).

References

- Berendsen, A. D., & Olsen, B. R. (2015). Bone development. *Bone*, *80*, 14–18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2015.04.035>.
- Chang, J.-K., Li, C.-J., Liao, H.-J., Wang, C.-K., Wang, G.-J., & Ho, M.-L. (2009). Anti-inflammatory drugs suppress proliferation and induce apoptosis through altering expressions of cell cycle regulators and pro-apoptotic factors in cultured human osteoblasts. *Toxicology*, *258*(2–3), 148–156. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2009.01.016>.
- Chen, G., Deng, C., & Li, Y.-P. (2012). TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *International Journal of Biological Sciences*, *8*(2), 272–288. <http://dx.doi.org/10.7150/ijbs.2929>.
- Clarkin, C. E., & Gerstenfeld, L. C. (2013). VEGF and bone cell signalling: An essential vessel for communication? *Cell Biochemistry and Function*, *31*(1), 1–11. <http://dx.doi.org/10.1002/cbf.2911>.
- Coultas, L., Chawengsaksophak, K., & Rossant, J. (2005). Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature*, *438*(7070), 937–945. <http://dx.doi.org/10.1038/nature04479>.
- Datta, H. K., Ng, W. F., Walker, J. A., Tuck, S. P., & Varanasi, S. S. (2008). The cell biology of bone metabolism. *Journal of Clinical Pathology*, *61*(5), 577–587. <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.2007.048868>.
- De Luna-Bertos, E., Ramos-Torrecillas, J., García Martínez, O., Guildford, A., Santin, M., & Ruiz, C. (2013). Therapeutic doses of nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit osteosarcoma mg-63 osteoblast-like cells maturation, viability, and biomineralization potential. *The Scientific World Journal*, *2013*, e809891. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/809891>.
- De Luna-Bertos, E., Ramos-Torrecillas, J., Manzano-Moreno, F. J., García-Martínez, O., & Ruiz, C. (2015). Effects on growth of human osteoblast-like cells of three nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Metamizole, dexametopfen, and ketorolac. *Biological Research for Nursing*, *17*(1), 62–67. <http://dx.doi.org/10.1177/1099800414527155>.
- Díaz-Rodríguez, L., García-Martínez, O., Arroyo-Morales, M., Reyes-Botella, C., & Ruiz, C. (2009). Antigenic phenotype and phagocytic capacity of MG-63 osteosarcoma line. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1173*(Suppl 1), E46–54. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04950.x>.
- Díaz-Rodríguez, L., García-Martínez, O., Arroyo-Morales, M., Rubio-Ruiz, B., & Ruiz, C. (2010). Effect of acetaminophen (paracetamol) on human osteosarcoma cell line MG63. *Acta Pharmacologica Sinica*, *31*(11), 1495–1499. <http://dx.doi.org/10.1038/aps.2010.129>.
- Díaz-Rodríguez, L., García-Martínez, O., De Luna-Bertos, E. D., Ramos-Torrecillas, J., & Ruiz, C. (2012). Effect of ibuprofen on proliferation, differentiation, antigenic expression, and phagocytic capacity of osteoblasts. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, *30*(5), 554–560. <http://dx.doi.org/10.1007/s00774-012-0356-2>.
- Díaz-Rodríguez, L., García-Martínez, O., Morales, M. A., Rodríguez-Pérez, L., Rubio-Ruiz, B., & Ruiz, C. (2012). Effects of indomethacin, nimesulide, and diclofenac on human MG-63 osteosarcoma cell line. *Biological Research for Nursing*, *14*(1), 98–107. <http://dx.doi.org/10.1177/1099800411398933>.
- Esser, J. S., Rahner, S., Deckler, M., Bode, C., Patterson, C., & Moser, M. (2015). Fibroblast growth factor signaling pathway in endothelial cells is activated by BMPER to promote angiogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *35*(2), 358–367. <http://dx.doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304345>.
- García-Martínez, O., De Luna-Bertos, E., Ramos-Torrecillas, J., Manzano-Moreno, F. J., & Ruiz, C. (2015). Repercussions of NSAIDs drugs on bone tissue: The osteoblast. *Life Sciences*, *123*, 72–77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2015.01.009>.
- Harada, S., Rodan, S. B., & Rodan, G. A. (1995). Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in osteoblasts. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, *313*, 76–80.
- Hu, K., & Olsen, B. R. (2016). Osteoblast-derived VEGF regulates osteoblast differentiation and bone formation during bone repair. *The Journal of Clinical Investigation*, *126*(2), 509–526. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI82585>.
- Huang, H., Ma, L., & Kyrkanides, S. (2016). Effects of vascular endothelial growth factor on osteoblasts and osteoclasts. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics: Official Publication of the American Association of Orthodontists, Its Constituent Societies, and the American Board of Orthodontics*, *149*(3), 366–373. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajodo.2015.09.021>.
- Ikedo, K., & Takeshita, S. (2014). Factors and mechanisms involved in the coupling from bone resorption to formation: How osteoclasts talk to osteoblasts. *Journal of Bone Metabolism*, *21*(3), 163–167. <http://dx.doi.org/10.11005/jbm.2014.21.3.163>.
- Kasagi, S., & Chen, W. (2013). TGF-beta1 on osteoimmunology and the bone component cells. *Cell & Bioscience*, *3*, 4. <http://dx.doi.org/10.1186/2045-3701-3-4>.
- Kronenberg, H. M. (2003). Developmental regulation of the growth plate. *Nature*, *423*(6937), 332–336. <http://dx.doi.org/10.1038/nature01657>.
- Kusumbe, A. P., Ramasamy, S. K., & Adams, R. H. (2014). Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. *Nature*, *507*(7492), 323–328. <http://dx.doi.org/10.1038/nature13145>.
- Lisignoli, G., Toneguzzi, S., Piacentini, A., Cristino, S., Cattini, L., Grassi, F., et al. (2004). Recruitment and proliferation of T lymphocytes is supported by IFN- γ - and TNF α -activated human osteoblasts: Involvement of CD54 (ICAM-1) and CD106 (VCAM-1) adhesion molecules and CXCR3 chemokine receptor. *Journal of Cellular Physiology*, *198*(3), 388–398. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.10427>.
- Loboda, A., Sobczak, M., Jozkowicz, A., & Dulak, J. (2016). TGF- β 1/Smads and miR-21 in renal fibrosis and inflammation. *Mediators of Inflammation*, *2016*, e8319283. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8319283>.
- Lucena, G., Reyes-Botella, C., García-Martínez, O., Díaz-Rodríguez, L., Alba, F., & Ruiz, C. (2013). Aminopeptidase activity profile in cultured human osteoblasts. *Biological Research for Nursing*, *15*(1), 56–61. <http://dx.doi.org/10.1177/1099800411414870>.
- Ornitz, D. M., & Marie, P. J. (2015). Fibroblast growth factor signaling in skeletal development and disease. *Genes & Development*, *29*(14), 1463–1486. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.266551.115>.
- Ragni, E., Viganò, M., Rebullà, P., Giordano, R., & Lazzari, L. (2013). What is beyond a qRT-PCR study on mesenchymal stem cell differentiation properties: How to choose the most reliable housekeeping genes. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *17*(1), 168–180. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1582-4934.2012.01660.x>.
- Song, Y. H., Zhu, Y. T., Ding, J., Zhou, F. Y., Xue, J. X., Jung, J. H., et al. (2016). Distribution of fibroblast growth factors and their roles in skin fibroblast cell migration. *Molecular Medicine Reports*, *14*(4), 3336–3342. <http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2016.5646>.
- Stanley, K. T., VanDort, C., Motyl, C., Endres, J., & Fox, D. A. (2006). Immunocompetent properties of human osteoblasts: Interactions with T lymphocytes. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, *21*(1), 29–36. <http://dx.doi.org/10.1359/JBMR.051004>.
- Whynott, R. M., Manahan, P., & Geisler, J. P. (2016). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and cyclooxygenase 2 (COX 2) immunostaining in ovarian cancer. *European Journal of Gynaecological Oncology*, *37*(2), 164–166.
- Yamamoto, N., Otsuka, T., Kondo, A., Matsushima-Nishiwaki, R., Kuroyanagi, G., Kozawa, O., et al. (2015). Rac limits TGF- β -induced VEGF synthesis in osteoblasts. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *405*, 35–41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2015.02.002>.
- Zelzer, E., & Olsen, B. R. (2005). Multiple roles of vascular endothelial growth factor (VEGF) in skeletal development, growth, and repair. *Current Topics in Developmental Biology*, *65*, 169–187. [http://dx.doi.org/10.1016/S0070-2153\(04\)65006-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0070-2153(04)65006-X).
- Zuo, C., Huang, Y., Bajis, R., Sahih, M., Li, Y.-P., Dai, K., et al. (2012). Osteoblastogenesis regulation signals in bone remodeling. *Osteoporosis International: A Journal Established as Result of Cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, *23*(6), 1653–1663. <http://dx.doi.org/10.1007/s00198-012-1909-x>.

OBJETIVO 3:

Analizar el efecto del celecoxib, un inhibidor selectivo de la COX-2, sobre diferentes parámetros celulares de los osteoblastos humanos en cultivo.

Research Paper

Effects of Therapeutic Doses of Celecoxib on Several Physiological Parameters of Cultured Human Osteoblasts

Víctor J. Costela-Ruiz^{1,2}, Lucia Melguizo-Rodríguez^{1,2}, Rebeca Illescas-Montes^{1,2}, Javier Ramos-Torrecillas^{1,2}, Francisco J. Manzano-Moreno^{2,3}, Concepción Ruiz^{1,2,4}✉, Elvira De Luna- Bertos^{1,2}

1. Biomedical Group (BIO277). Department of Nursing, Faculty of Health Sciences. University of Granada, Avda. Ilustración 60, 18016. Granada, Spain.
2. Instituto Investigación Biosanitaria, ibs.Granada, C/ Doctor Azpitarte 4, 4ª planta, 18012. Granada, Spain.
3. Biomedical Group (BIO277). Department of Stomatology, School of Dentistry, University of Granada, Colegio Máximo, Campus Universitario de Cartuja 18071. Granada, Spain.
4. Institute of Neuroscience, University of Granada, Centro de Investigación Biomédica (CIBM). Parque de Tecnológico de la Salud (PTS) Avda. del Conocimiento S/N, 18016. Armilla, Granada, Spain.

✉ Corresponding author: Concepción Ruiz. Faculty of Health Sciences. University of Granada. Avda. De la Ilustración 60, 18016. Granada, Spain. e-mail: crr@ugr.es

© The author(s). This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>). See <http://ivyspring.com/terms> for full terms and conditions.

Received: 2019.06.24; Accepted: 2019.08.13; Published: 2019.09.20

Abstract

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), including cyclooxygenase-2 (COX-2)-selective NSAIDs, are associated with adverse effects on bone tissue. These drugs are frequently the treatment of choice but are the least studied with respect to their repercussion on bone. The objective of this study was to determine the effects of celecoxib on cultured human osteoblasts. Human osteoblasts obtained by primary culture from bone samples were treated with celecoxib at doses of 0.75, 2, or 5 μ M for 24 h. The MTT technique was used to determine the effect on proliferation; flow cytometry to establish the effect on cell cycle, cell viability, and antigenic profile; and real-time polymerase chain reaction to measure the effect on gene expressions of the differentiation markers RUNX2, alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin (OSC), and osterix (OSX). Therapeutic doses of celecoxib had no effect on osteoblast cell growth or antigen expression but had a negative impact on the gene expression of RUNX2 and OSC, although there was no significant change in the expression of ALP and OSX. Celecoxib at therapeutic doses has no apparent adverse effects on cultured human osteoblasts and only inhibits the expression of some differentiation markers. These characteristics may place this drug in a preferential position among NSAIDs used for analgesic and anti-inflammatory therapy during bone tissue repair.

Key words: celecoxib, osteoblasts, COX-2 selective NSAIDs, osteoblast differentiation, bone.

Introduction

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) include a large group of drugs that inhibit the cyclooxygenase enzyme (COX). These are divided between non-selective and selective inhibitors of COX-2 and are widely used in clinical practice to control pain and inflammation, especially in orthopedics and bone surgery (1,2).

Various *in vitro* studies have found that NSAIDs exert adverse effects on the physiology of osteoblasts, including: inhibition of their proliferative capacity and

cell differentiation; alteration of their antigenic profile; and modulation of the gene expression of markers involved in cell growth and maturation and bone mineralization (3–9). In parallel, various *in vivo* studies have shown that these drugs affect bone tissue through a delay in bony callus formation in fractures (10,11) or a loss of bone mineral density (12), among others. However, research to date has mainly focused on non-selective NSAIDs.

Studies on the effect of COX-2 selective NSAIDs

on bone tissue have largely been conducted in animal models and murine cell lines (13). There are currently no conclusive data on celecoxib, a potent selective NSAID mainly used in orthopedics and rheumatology. Some authors reported its adverse effects on bone formation in animal models (14), whereas others observed no celecoxib-related bone involvement (15).

The objective of this study was to determine the impact of celecoxib on cultured human osteoblasts by analyzing the effect of different celecoxib doses on the growth, antigenic profile, and gene expression of human osteoblasts obtained by primary culture from bone samples.

Material and methods

Primary Human Osteoblast

Human bone tissue was obtained from the Department of Stomatology of the University of Granada. All participants provided written informed consent to participate in this study, which was approved by the Ethical Committee of the University of Granada (Reg. No. 524/CEIH/2018). Primary osteoblasts were harvested from anonymous tissue in bone chips gathered during mandibular osteotomy or the surgical removal of lower wisdom teeth. We included a total of 3 donors in order to do all the assays for triplicate; 2 male and 1 female (30, 26 and 27 years old respectively). These cells were collected and cultured according to a standardized protocol (9), establishing three cell lines of primary culture human osteoblasts cultured. Cells were cultured until passage 4 to 6 before the treatment.

Treatments

The osteoblastic cell lines were treated for 24 h with celecoxib (Sigma, St Louis, MO, USA) at doses of 0.75, 2, or 5 μM ; untreated cells served as controls.

Cell proliferation

Cell proliferation was determined by the MTT method as reported by Illescas-Montes et al. (16). Osteoblasts were seeded at 1×10^4 cells/mL per well into a 96-well plate without fetal bovine serum (FBS) and cultured at 37 °C for 24 h. The medium was then replaced with Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM) containing celecoxib at a dose of 0.75, 2, or 5 μM . After 24 h, the medium was replaced with DMEM containing 0.5 mg/mL MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) supplied by Sigma and incubated for 4 h. Cellular reduction of the MTT tetrazolium ring resulted in the formation of a dark-purple water-insoluble deposit of formazan crystals. After

incubation, the medium was aspirated and DMSO was added to dissolve the formazan crystals. Absorbance was measured at 570 nm with a spectrophotometer (Sunrise™, Tecan, Männedorf, Switzerland).

Cell Cycle

Cultured human osteoblast cells treated with 0.75, 2, or 5 μM celecoxib or with no NSAID treatment (controls) were detached from the culture flask with a solution of 0.05 % trypsin (Sigma) and 0.02 % ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) (Sigma) and were then washed and suspended in phosphate buffered saline (PBS) and prepared for the cell cycle study by flow cytometry as previously reported (16).

Apoptosis and necrosis analysis

Cultured human osteoblast cells treated with 0.75, 2, or 5 μM celecoxib for 24 h or with no NSAID treatment (controls) were detached from the culture flask, washed, suspended in 300 μL PBS, and then labeled with annexin V and propidium iodide (PI) (Immunostep S.L., Salamanca, Spain). We incubated 100 μL aliquots of the cell suspension with 5 μL annexin V and 5 μL PI for 30 min at 4 °C in the dark. Cells were then washed, suspended in 1 mL PBS, and immediately analyzed in a flow cytometer with argon laser (Fasc Vantage Becton Dickinson, Palo Alto, CA) at a wavelength of 488 nm to determine the percentage of fluorescent cells. We calculated the percentage of annexin-positive (apoptotic) cells and PI-positive (necrotic) cells from counts of 2,000-3,000 cells.

Antigenic phenotype

Antigenic phenotype was studied by flow cytometry at 24 h of culture after treatment with 0.75, 2, or 5 μM celecoxib. Untreated cells served as controls. Cells were detached from the cultured flask 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 (ICAM-1 monoclonal antibody [MEM-111], FITC; human CD80 [B7-1, BB1], FITC; human CD86 [B7-2, B70], FITC; and anti-human HLA-DR [Clas II], FITC; respectively, from Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Spain). Cells were subsequently analyzed by flow cytometry (FASC Canton II, SE Becton Dickinson, Palo Alto, CA) as previously described Melguizo-Rodríguez et al. (8).

Gene expression determination by real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Gene expression analysis was performed as described Bustin et al. (17), Manzano-Moreno et al.

(18) and Ragni et al. (19):

RNA extraction and cDNA synthesis (reverse transcription)

After 24 h of culture with Celecoxib treatment (untreated cells served as controls), cells were detached from the culture flask using 0.05% trypsin-EDTA solution (Sigma) and individually harvested. mRNA was extracted using a silicate gel technique in the QiagenRNeasy 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 of total RNA in 40 µl of total volume) was reverse-transcribed to cDNA and amplified by PCR using the iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA), following the manufacturer's instructions.

Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)

Primers were designed using NCBI-nucleotide library and Primer3-design (Table 1) to detect mRNA of RUNX2, OSC, OSX, and ALP. All were matched to the mRNA sequences of 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.

Quantitative RT-PCR (q-RT-PCR) was conducted using the SsoFast™ EvaGreen® Supermix Kit (Bio-Rad laboratories) and following the manufacturer's instructions. Samples were amplified in 96-well microplates in an IQ5-Cycler (Bio-Rad laboratories) at a specific annealing temperature for each gene, ranging from 60 to 65 °C, and at an elongation temperature of 72 °C over 40 cycles. PCR reactions were carried out in a final volume of 20 µL, with 5 µL of cDNA sample and 2 µL of each primer. Ct values were plotted against log cDNA dilution to construct standard curves for each target gene. After each RT-PCR, a melting profile was created and agarose gel electrophoresis was conducted in each sample to rule out nonspecific PCR products and primer dimers. The comparative Ct method was employed for the relative quantification of gene expression. The mRNA concentration for each gene was expressed as ng of mRNA per average ng of housekeeping mRNAs. The cDNA from individual cell experiments was analyzed in triplicate RT-PCR studies.

Table 1. Primer sequences for the amplification of cDNA by real-time PCR.

Gene	Sense primer	Antisense primer	Amplicon (bp)
RUNX2	50	50	143
	-TGGTTAATCTCCGCA GGTCAC-30	-ACTGTGCTGAAGAG GCTGTTTG-30	
OSX	50	50	205
	-TGCCTAGAAGCCCTG AGAAA-30	-TTTAACITGGGGCCT TGAGA-30	
ALP	50	50	175
	-CCAACGTGGCTAAG AATGTCATC-30	-TGGGCATTGGTGTG TACGTC-30	
OSC	50	50	258
	-CCATGAGAGCCCTC ACACTCC-30	-GGTCAGCCAACCTCGT CACAGTC-30	

Statistical analysis

R software (version 2.9.2, Auckland, New Zealand) was used for data analyses. Mean values (\pm standard deviation) were calculated for each variable. A two-way repeated-measures analysis of variance (ANOVA) was performed to analyze the effects on proliferation, cell cycle, apoptosis/necrosis induction, and gene expression, considering treatment (celecoxib), time (24 h), and concentration (0.75, 2, or 5 µM). When significant interactions were identified, the Bonferroni correction was applied for planned pair-wise comparisons. $P \leq 0.05$ was considered significant. Antigenic profiles were compared using the Student's t-test. $P \leq 0.05$ was considered statistically significant in all tests. At least three experiments were performed in all assays and for each culture.

Results

Effect of celecoxib on osteoblast proliferation

Figure 1 depicts the effect of celecoxib on cell proliferation after 24 h of treatment with doses of 0.75, 2, or 5 µM. No significant changes in the proliferative capacity of osteoblasts were observed after treatment at any assayed dose of the drug.

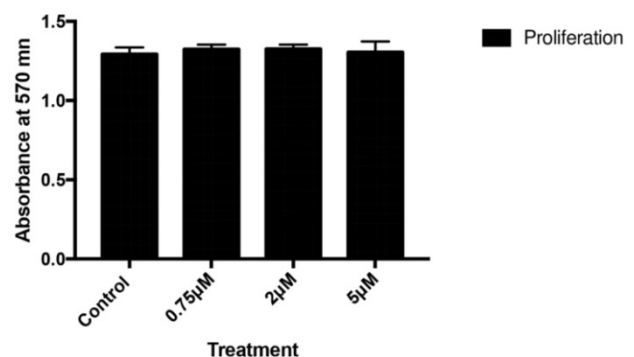


Figure 1. Effects of different celecoxib doses (0.75, 2, or 5 µM) on osteoblast proliferation after 24 h of treatment. Data are expressed as means \pm SD. Analysis of variance was used to compare data between each treatment and control culture.

Effect of celecoxib on osteoblast cell cycle

Treatment with 0.75, 2, or 5 μM celecoxib for 24 h produced no significant changes in osteoblast cell cycle, finding similar cell percentages in G0/G1, G2/M, and S phases to those observed in the controls (Figure 2).

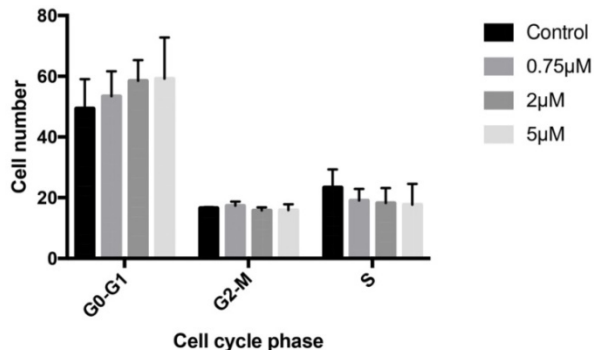


Figure 2. Effects of celecoxib on cell cycle determined by flow cytometry. Cultured cells were treated for 24 h with 0.75, 2, or 5 μM celecoxib. The control group was not treated. G0/G1, S, and G2/M represent the percentage of cells distributed among these phases after treatment, as determined by flow cytometry. Experiments were repeated at least three times.

Effect of celecoxib on osteoblast in apoptosis

No signs of cell apoptosis and/or necrosis were detected after osteoblast treatment with 0.75, 2, or 5 μM celecoxib for 24 h (Table 2).

Table 2. Results of apoptosis assay in cultured cells treated for 24 h with celecoxib doses of 0.75, 2, or 5 μM .

	Necrotic cells			Viable cells			Apoptotic cells		
	Mean	P Value	SD	Mean	P Value	SD	Mean	P Value	SD
Control	0,633	-	0,321	91,233	-	10,404	8,133	-	10,082
0,75	0,466	0,519	0,251	91,666	0,952	5,396	7,866	0,970	5,492
2	0,366	0,230	0,057	83,566	0,295	3,655	16,066	0,269	3,611

Effect of celecoxib on the expression of RUNX2, ALP, OSX, and OSC genes

Figures 3 and 4 depict the q-RT-PCR results for the expression of osteoblast differentiation makers RUNX2, ALP, OSX, and OSC. After 24 h of treatment at a dose of 2 or 5 μM , osteoblast expression of RUNX2 (figure 3A) and OSC (figure 3B) was significantly lower versus controls (Figure 3).

However, no changes in the expression of these markers were observed at the lowest dose (0.75 μM). ALP (Figure 4A) and OSX (Figure 4B) expression did not change after treatment with celecoxib at any assayed dose (Figure 4).

Effect of celecoxib on phenotypic profile

Expression of CD54, CD80, CD86, or HLA-DR genes did not significantly differ between cells treated for 24 h with 0.75, 2, or 5 μM celecoxib and untreated control cells (Figure 5).

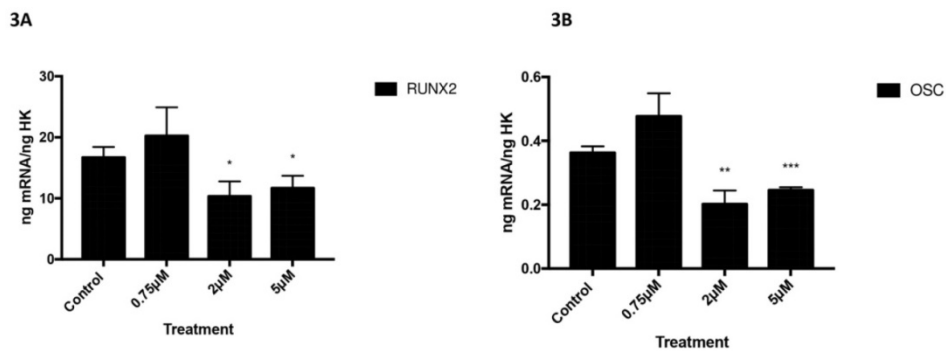


Figure 3. Expression of RUNX2 (3A) and OSC (3B) genes after 24 h treatment with 0.75, 2, or 5 μM . Data expressed as percentage expression with respect to control \pm SD. (***) $P \leq 0.0001$; ** $P \leq 0.01$; * $P \leq 0.05$.

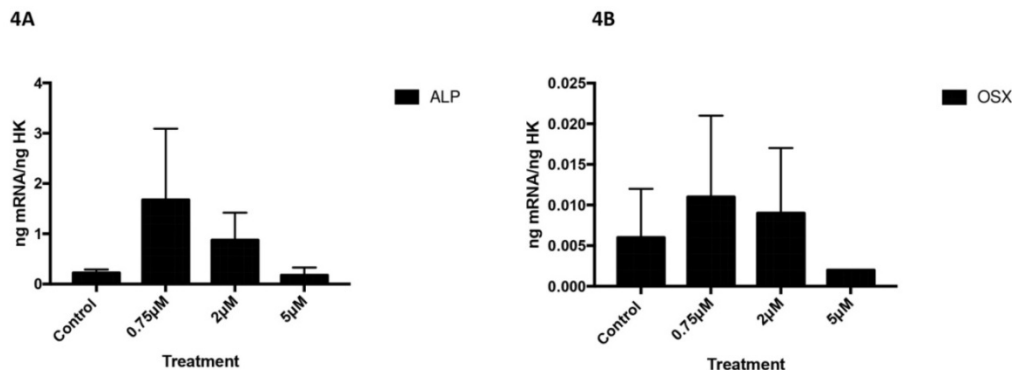


Figure 4. Expression of ALP (4A) and OSX (4B) genes after 24 h treatment with 0.75, 2, or 5 μM . Data expressed as percentage expression with respect to control \pm SD. (***) $P \leq 0.0001$; ** $P \leq 0.01$; * $P \leq 0.05$.

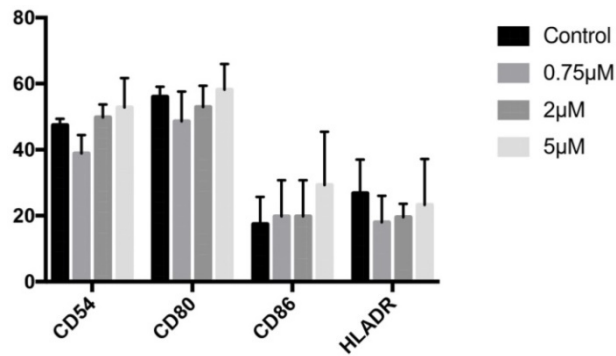


Figure 5. Expression of CD54, CD80, CD86, and HLA-DR genes by cells treated for 24 h with celecoxib (0.75, 2, or 5 μ M). Data are expressed as percentage expression with respect to control \pm SD.

Discussion

Treatment of primary culture human osteoblasts with therapeutic doses of celecoxib, a COX-2 selective NSAID, had no significant effects on their antigenic profile, growth, proliferation, or cell cycle and produced no signs of cell death. However, this treatment reduced the gene expression of RUNX2 and OSC, two biological markers with an important role in osteoblast differentiation, whereas no changes were observed in the expression of ALP or OSX. These results suggest that celecoxib, unlike other NSAIDs (7), acts on the expression of some of the genes involved in cell differentiation but does not affect other cell parameters such as growth or antigen expression.

The finding that celecoxib at 0.75, 2, or 5 μ M (within the therapeutic range) has no effect on osteoblast growth is in line with previously published results. For instance, proapoptotic effects were observed after the treatment of MG63 human osteoblast cells with celecoxib at a dose of 50 μ M but not at a dose of 2 or 10 μ M (20), and no changes in the proliferation or viability of the murine pre-osteoblastic cell line MC3T3-E1 were observed after treatment with celecoxib at a dose of 20 μ M (21). However, celecoxib at doses of 0.1 or 1 μ M was found to inhibit cell proliferation and arrest the cell cycle in G0/G1 phase in cultured human osteoblasts (4) and in mesenchymal cells derived from mouse bone marrow (22). This last effect has been reported for other non-selective NSAIDs, in which the drug dose plays an important role (5,6,23).

The above effects of celecoxib on osteoblasts *in vitro* are closely related to observations in experimental animals. Thus, Kasukawa et al. (15) treated ovariectomized mice at a dose of 4 mg/kg for four weeks and found no change in bone formation but observed an effect on C-telopeptide, a marker related to resorption, a function carried out at bone

level by osteoclasts. Liu et al. (24) treated *Sprague Dawley* rats with daily doses of 50 mg/kg celecoxib for two weeks and also observed no significant effect on bone formation.

Celecoxib does not appear to compromise bone healing, given that bone fusion was not altered by its administration at 10 mg/kg/day for eight weeks to rabbits after posterolateral intertransverse arthrodesis (25). In another study, Brown et al. (26) treated male rats with 3 mg/kg/day celecoxib or 1 mg/kg/day indomethacin for four or eight weeks and found no difference in healing *versus* controls for the celecoxib-treated rats but a delay in healing for the indomethacin-treated animals. Osteoblasts are directly involved in bone fracture healing, being the cells responsible for bone formation and repair during this process (27,28).

Osteoblasts have a characteristic antigenic profile, including antigens whose expression is modulated by the degree of cell maturation and/or the presence of certain biomolecules such as proinflammatory cytokines (29,30). Various NSAIDs have been found to modulate the expression of CD54, CD80, and HLA-DR (5,23,31). However, celecoxib treatment did not change the expression of these markers at any dose assayed in the present study.

Although no effect on osteoblast growth or antigenic profile was observed, celecoxib doses of 2 and 5 μ M inhibited the gene expression of differentiation markers RUNX2 and OSC but not ALP or OSX. Matsuyama et al. (21) reported that celecoxib doses between 0.02 and 20 μ M inhibit osteoblast differentiation in the MC3T3-E1 line but do not alter cell viability, indicating that negative effects on bone tissue at doses above 0.02 μ M may be attributable to the inhibition of osteoblast differentiation. Nagano et al. (32) found that 50 μ M celecoxib can inhibit the expression of RUNX2 mRNA in the same cell line (MC3T3-E1).

OSC is a peptide hormone secreted by osteoblasts during bone formation at a late stage of osteoblast differentiation, and it participates in bone mineralization and osteoclast activity regulation (33). It is transcribed by the RUNX2/CBFA1 complex (34). This raises the question whether the decrease in OSC expression is directly caused by the celecoxib treatment or is indirectly produced by its inhibitory effect on the expression of RUNX2. Celecoxib was found to negatively affect bone formation in mice, observing a reduced expression of OSC mRNA in bone marrow samples from those administered with 30 mg/kg celecoxib twice daily for five days (14).

Selective and non-selective NSAIDs are used in the treatment of heterotopic ossification, which can appear after surgery, especially arthroplasty. This

ossification of soft tissue results from an abnormal differentiation to bone cells of mesenchymal stem cells. NSAIDs are used to inhibit the bone differentiation of progenitors and prevent this surgical complication (35–38). These data may be related to our finding of a celecoxib-induced decrease in the gene expression of markers such as RUNX2 and OSC. However, celecoxib treatment was found to reduce inflammation in rats with collagen-induced arthritis, and high doses of this drug prevented bone loss adjacent to inflamed joints and significantly decreased bone resorption but had no impact on bone formation (39). The authors concluded that celecoxib had a preventive effect on both growth plate destruction and bone loss adjacent to inflamed joints in this arthritis model.

In summary, our study shows that therapeutic doses of celecoxib, ranging from 0.75 to 5 μ M, have no adverse effects on osteoblast growth or antigen expression but reduce the gene expression of RUNX2 and OSC. It is not possible to establish whether this reduction affects physiological bone development given the absence of changes in the expression of ALP or OSX, also involved in differentiation. Further studies are required to determine whether celecoxib interferes with the maturation of osteoblasts and therefore with their function at bone tissue level. Nevertheless, our results indicate that this NSAID is a good option for analgesic and anti-inflammatory therapy during bone tissue repair.

Acknowledgements

This study was supported by research group BIO277 (Junta de Andalucía) and Department of Nursing (University of Granada). The work outlined in this article has been supported by the Spanish Ministry of Education under FPU fellowship reference FPU15-05635 and FPU16-04141.

Competing Interests

The authors have declared that no competing interest exists.

References

- [Internet] Flórez J. <https://www.elsevier.com/books/farmacologia-humana/florez-beledo/978-84-458-2316-3>.
- [Internet] Saad J. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526006/>
- [Internet] Evans y Butcher. <https://pdfs.semanticscholar.org/cac9/b8662571424bbfead0991d70e4f7fcb5514.pdf>
- Chang J-K, Li C-J, Liao H-J, Wang C-K, Wang G-J, Ho M-L. Anti-inflammatory drugs suppress proliferation and induce apoptosis through altering expressions of cell cycle regulators and pro-apoptotic factors in cultured human osteoblasts. *Toxicology*. 2009 Apr 28;258(2-3):148–56.
- De Luna-Bertos E, Ramos-Torrecillas J, García-Martínez O, Guildford A, Santin M, Ruiz C. Therapeutic Doses of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Inhibit Osteosarcoma MG-63 Osteoblast-Like Cells Maturation, Viability, and Biomineralization Potential. *ScientificWorldJournal* [Internet]. 2013 Sep 19

- [cited 2018 Nov 20];2013. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3793504/>
- De Luna-Bertos E, Ramos-Torrecillas J, Manzano-Moreno FJ, García-Martínez O, Ruiz C. Effects on growth of human osteoblast-like cells of three nonsteroidal anti-inflammatory drugs: metamizole, dextketoprofen, and ketorolac. *Biol Res Nurs*. 2015 Jan;17(1):62–7.
 - García-Martínez O, De Luna-Bertos E, Ramos-Torrecillas J, Manzano-Moreno FJ, Ruiz C. Repercussions of NSAIDs drugs on bone tissue: the osteoblast. *Life Sci*. 2015 Feb 15;123:72–7.
 - Melguizo-Rodríguez L, Costela-Ruiz VJ, Manzano-Moreno FJ, Illescas-Montes R, Ramos-Torrecillas J, García-Martínez O, et al. Repercussion of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the gene expression of human osteoblasts. *PeerJ*. 2018;6:e5415.
 - Manzano-Moreno FJ, Costela-Ruiz VJ, Melguizo-Rodríguez L, Illescas-Montes R, García-Martínez O, Ruiz C, et al. Inhibition of VEGF gene expression in osteoblast cells by different NSAIDs. *Arch Oral Biol*. 2018 Aug;92:75–8.
 - Burd TA, Hughes MS, Anglen JO. Heterotopic ossification prophylaxis with indomethacin increases the risk of long-bone nonunion. *J Bone Joint Surg Br*. 2003 Jul;85(5):700–5.
 - Bhattacharyya T, Levin R, Vrahas MS, Solomon DH. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and nonunion of humeral shaft fractures. *Arthritis Rheum*. 2005 Jun 15;53(3):364–7.
 - Pountos I, Georgouli T, Calori GM, Giannoudis PV. Do nonsteroidal anti-inflammatory drugs affect bone healing? A critical analysis. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:606404.
 - Goodman S, Ma T, Trindade M, Ikenoue T, Matsuura I, Wong N, et al. COX-2 selective NSAID decreases bone ingrowth in vivo. *J Orthop Res*. 2002 Nov;20(6):1164–9.
 - Nakai K, Tanaka S, Sakai A, Nagashima M, Tanaka M, Otomo H, et al. Cyclooxygenase-2 selective inhibition suppresses restoration of tibial trabecular bone formation in association with restriction of osteoblast maturation in skeletal reloading after hindlimb elevation of mice. *Bone*. 2006 Jul;39(1):83–92.
 - Kasukawa Y, Miyakoshi N, Srivastava AK, Nozaka K, Maekawa S, Baylink DJ, et al. The selective cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib reduces bone resorption, but not bone formation, in ovariectomized mice in vivo. *Tohoku J Exp Med*. 2007 Mar;211(3):275–83.
 - Illescas-Montes R, Melguizo-Rodríguez L, Manzano-Moreno FJ, García-Martínez O, Ruiz C, Ramos-Torrecillas J. Cultured Human Fibroblast Biostimulation Using a 940 nm Diode Laser. *Materials (Basel)*. 2017 Jul 13;10(7).
 - Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*. 2009 Apr 1;55(4):611–22.
 - Manzano-Moreno FJ, Ramos-Torrecillas J, Melguizo-Rodríguez L, Illescas-Montes R, Ruiz C, García-Martínez O. Bisphosphonate Modulation of the Gene Expression of Different Markers Involved in Osteoblast Physiology: Possible Implications in Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw. *Int J Med Sci*. 2018;15(4):359–67.
 - Ragni E, Viganò M, Rebulla 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*. 2013 Jan;17(1):168–80.
 - Kolar P, Lach S, Gaber T, Maschmeyer P, Dziurla R, Tripmacher R, et al. Effects of celecoxib on the expression of osteoprotegerin, energy metabolism and cell viability in cultured human osteoblastic cells. *Clin Exp Rheumatol*. 2009 Feb;27(1):99–107.
 - Matsuyama A, Higashi S, Tanizaki S, Morotomi T, Washio A, Ohsumi T, et al. Celecoxib inhibits osteoblast differentiation independent of cyclooxygenase activity. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2018 Jan;45(1):75–83.
 - Chang J-K, Li C-J, Wu S-C, Yeh C-H, Chen C-H, Fu Y-C, et al. Effects of anti-inflammatory drugs on proliferation, cytotoxicity and osteogenesis in bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochem Pharmacol*. 2007 Nov 1;74(9):1371–82.
 - 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*. 2012 Jan;14(1):98–107.
 - Liu Y, Cui Y, Chen Y, Gao X, Su Y, Cui L. Effects of dexamethasone, celecoxib, and methotrexate on the histology and metabolism of bone tissue in healthy Sprague Dawley rats. *Clin Interv Aging*. 2015;10:1245–53.
 - Long J, Lewis S, Kuklo T, Zhu Y, Riew KD. The effect of cyclooxygenase-2 inhibitors on spinal fusion. *J Bone Joint Surg Am*. 2002 Oct;84-A(10):1763–8.
 - Brown KM, Saunders MM, Kirsch T, Donahue HJ, Reid JS. Effect of COX-2-specific inhibition on fracture-healing in the rat femur. *J Bone Joint Surg Am*. 2004 Jan;86-A(1):116–23.
 - Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Arch Biochem Biophys*. 2014 Nov 1;561:3–12.
 - Bahney CS, Zondervan RL, Allison P, Theologis A, Ashley J, Ahn J, et al. The Cellular Biology of Fracture Healing. *J Orthop Res*. 2018 Oct 28;
 - Ruiz C, Reyes-Botella C, García-Martínez O, Montes MJ. Modulation of antigenic phenotype by IL-1beta, IFNgamma and TGFbeta on cultured human decidual stromal cells. *Biosci Rep*. 2004 Feb;24(1):55–62.
 - 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*. 2006 Aug;26(4):281–9.

31. Díaz-Rodríguez L, García-Martínez O, De Luna-Bertos E, Ramos-Torrecillas J, Ruiz C. Effect of ibuprofen on proliferation, differentiation, antigenic expression, and phagocytic capacity of osteoblasts. *J Bone Miner Metab.* 2012 Sep;30(5):554–60.
32. Nagano A, Arioka M, Takahashi-Yanaga F, Matsuzaki E, Sasaguri T. Celecoxib inhibits osteoblast maturation by suppressing the expression of Wnt target genes. *J Pharmacol Sci.* 2017 Jan;133(1):18–24.
33. Wei J, Karsenty G. An overview of the metabolic functions of osteocalcin. *Rev Endocr Metab Disord.* 2015 Jun;16(2):93–8.
34. Neve A, Corrado A, Cantatore FP. Osteocalcin: skeletal and extra-skeletal effects. *J Cell Physiol.* 2013 Jun;228(6):1149–53.
35. Neal B, Rodgers A, Dunn L, Fransen M. Non-steroidal anti-inflammatory drugs for preventing heterotopic bone formation after hip arthroplasty. *Cochrane Database Syst Rev.* 2000;(3):CD001160.
36. Goodman SB, Ma T, Mitsunaga L, Miyanishi K, Genovese MC, Smith RL. Temporal effects of a COX-2-selective NSAID on bone ingrowth. *J Biomed Mater Res A.* 2005 Mar 1;72(3):279–87.
37. Kan S-L, Yang B, Ning G-Z, Chen L-X, Li Y-L, Gao S-J, et al. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs as Prophylaxis for Heterotopic Ossification after Total Hip Arthroplasty: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore).* 2015 May;94(18):e828.
38. Ranganathan K, Loder S, Agarwal S, Wong VW, Wong VC, Forsberg J, et al. Heterotopic Ossification: Basic-Science Principles and Clinical Correlates. *J Bone Joint Surg Am.* 2015 Jul 1;97(13):1101–11.
39. Tsuboi H, Nampei A, Matsui Y, Hashimoto J, Kawai S, Ochi T, et al. Celecoxib prevents juxta-articular osteopenia and growth plate destruction adjacent to inflamed joints in rats with collagen-induced arthritis. *Mod Rheumatol.* 2007 Apr 1;17(2):115–22.

CONCLUSIONES

1. El tratamiento *in vitro* de osteoblastos humanos con dosis de 10 μ M de indometacina, ketoprofeno, diclofenaco, ibuprofeno, ketorolaco, naproxeno, piroxicam o acetaminofén, puede modular la expresión de determinados genes directamente implicados en el crecimiento, diferenciación/maduración y función de esta población celular, lo que sugiere un efecto adverso de dichos fármacos sobre la fisiología del osteoblasto y por consiguiente sobre el tejido óseo.
2. La expresión del VEGF en dos poblaciones de células osteoblásticas (osteoblastos humanos obtenidos por cultivo primario y células osteoblásticas de la línea MG63) disminuye como consecuencia del tratamiento con indometacina, ketoprofeno, diclofenaco, ibuprofeno, ketorolaco, naproxeno, piroxicam o acetaminofén a la dosis de 10 μ M; lo que podría tener una repercusión directa sobre el osteoblasto; así como, sobre otras células presentes en el hueso y muy especialmente sobre el proceso regenerativo óseo.
3. Dosis terapéuticas de celecoxib (0,75, 2 y 5 μ M) no muestran efectos adversos sobre el crecimiento o sobre el perfil antigénico del osteoblasto humano en cultivo; aunque si actúa a la dosis de 2 y 5 μ M inhibiendo la expresión de determinados genes (Runx2 y OSC) implicados directamente en la diferenciación de estas células. No obstante, estos resultados pueden situar a este AINE selectivo de la COX-2 frente a los AINEs no selectivos en una posición preferente en el tratamiento de procesos inflamatorios y álgicos durante cuadros relacionados con el tejido óseo.

CONCLUSIONS

1. *In vitro* treatment of human osteoblasts with a dose of 10 μ M of indometacin, ketoprofen, diclofenac, ibuprofen, ketorolac, naproxen, piroxicam o acetaminophen; can modulate the expression of certain genes directly involved in growth, differentiation/maturation and function of this cell population. This suggests an adverse effect of these drugs on the physiology of the osteoblast and consequently of bone tissue.
2. The expression of VEGF in two populations of osteoblast cells (human osteoblasts obtained by primary culture and the osteoblastic line MG63) decreases as a result of treatment with indometacin, ketoprofen, diclofenac, ibuprofen, ketorolac, naproxen, piroxicam o acetaminophen at dose of 10 μ M. This could have a direct impact on the osteoblast, as well as in other bone cells and in bone regenerative process.
3. Therapeutic doses of celecoxib (0.75, 2 y 5 μ M) do not show adverse effects on growth or on the antigenic profile of human osteoblast in culture. At the dose of 2 and 5 μ M, celecoxib inhibits the expression of certain genes (Runx2 and OSC) directly involved in the differentiation of these cells. However, these results can place this COX-2 selective NSAID in a preference position in the treatment of inflammatory and pain processes in bone related pathologies.