

**FASE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS DEL POTENCIAL ANTI RESORTIVO DE LA N -
ACETILCISTEÍNA (NAC), EL PROPIONATO DE CLOBETASOL Y EL HIDRÓXIDO DE
CALCIO EN UN MODELO *IN VITRO* DE CÉLULAS U937**

Marcela Gabriela Palma Terán

Natalia Rodríguez Rojas

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE
PROGRAMA DE ENDODONCIA - FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
BOGOTA DC. - JULIO DE 2022**

HOJA DE IDENTIFICACIÓN

Universidad	El Bosque
Facultad	Odontología
Programa	Endodoncia
Título:	Fase experimental y resultados del potencial anti resorptivo de la N - acetilcisteína (NAC), el propionato de clobetasol y el hidróxido de calcio en un modelo <i>in vitro</i> de células U937
Línea de investigación:	Endodoncia
Otras instituciones participantes:	Facultad de Medicina - Universidad Nacional de Colombia - Laboratorio de biología molecular de virus
Grupo de Investigación:	Unidad de Epidemiología Clínica Oral - UNIECLO
Tipo de investigación:	Posgrado /Grupo de investigación
Estudiantes:	Marcela Gabriela Palma Terán Natalia Rodríguez Rojas
Director:	Dr. Henry Sossa Rojas
Codirectores	Dra. Diana Carolina Alzate Mendoza Dr. Luis Fernando Gamboa Martínez
Asesor metodológico:	Dr. Luis Fernando Gamboa Martínez
Otros asesores	Dra. Angie Bedoya Rodríguez Dr. Juan Arteaga Rosero
Asesor y análisis estadístico:	Dra. Angie Bedoya Rodríguez

DIRECTIVOS UNIVERSIDAD EL BOSQUE

OTTO BAUTISTA GAMBOA	Presidente del Claustro
JUAN CARLOS LÓPEZ TRUJILLO	Presidente Consejo Directivo
MARIA CLARA RANGEL GALVIS	Rector(a)
NATALIA RUÍZ ROGERS	Vicerrector(a) Académico
RICARDO ENRIQUE GUTIÉRREZ MARÍN	Vicerrector Administrativo
GUSTAVO SILVA CARRERO	Vicerrectoría de Investigaciones
CRISTINA MATIZ MEJÍA	Secretaria General
JUAN CARLOS SANCHEZ PARIS	División Postgrados
MARIA ROSA BUENAHORA TOVAR	Decana Facultad de Odontología
MARTHA LILIANA GÓMEZ RANGEL	Secretaria Académica
DIANA MARIA ESCOBAR JIMENEZ	Director Área Bioclínica
ALEJANDRO PERDOMO RUBIO	Director Área Comunitaria
JUAN GUILLERMO ÁVILA ALCALÁ	Coordinador Área Psicosocial
INGRID ISABEL MORA DIAZ	Coordinador de Investigaciones Facultad de Odontología
IVAN ARMANDO SANTACRUZ CHAVES	Coordinador Postgrados Facultad de Odontología
DIANA CAROLINA ALZATE MENDOZA	Directora Programa Especialización en endodoncia

“La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.

GUÍA DE CONTENIDO

Resumen

Abstract

	Pág.
1. Introducción	1
2. Marco teórico	3
3. Planteamiento del problema	22
4. Pregunta de investigación	24
5. Justificación	25
6. Estado del arte	26
7. Objetivos	28
8. Metodología del desarrollo del estudio	29
8.1. Láminas de hueso	29
8.2. Fusión con PEG	29
8.3. Siembra y tratamiento con NAC, clobetasol e hidróxido de calcio	29
8.4. Prueba de fusión	30
8.5. Evaluación niveles ROS	30
8.6. Anillos de actina	30
8.7. Evaluación de la expresión de fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP)	31
8.8. Evaluación de la actividad resortiva	31
9. Hipótesis	32
10. Análisis estadístico	33
11. Resultados	34
11.1. ROS	34
11.2. TRAP	35
11.3. Resorción	36
11.4. Anillos de actina	38
12. Discusión	40
13. Conclusión	43
14. Referencias bibliográficas	44

LISTADO DE FIGURAS

		Págs.
Figura 1	Esquema del osteoclasto. Imagen tomada de https://loshumerouno.wordpress.com/histologia-del-hueso/celulas-del-tejido-oseo/osteoclastos/ y modificada por <i>Palma et al.</i>	3
Figura 2	Evaluación de ROS sobre láminas óseas con los diferentes tratamientos, día 2. Fotos tomadas por <i>Palma et al. 2021</i>	34
Figura 3	Evaluación de ROS sobre láminas óseas con los diferentes tratamientos, día 4. Fotos tomadas por <i>Palma et al. 2021</i>	34
Figura 4	Gráfica comparativa de niveles de ROS con los diferentes tratamientos. Diseñada por <i>Palma et al.</i>	35
Figura 5	Evaluación de TRAP sobre láminas óseas con los diferentes tratamientos, día 2. Fotos tomadas por <i>Palma et al. 2021</i>	35
Figura 6	Evaluación de TRAP sobre láminas óseas con los diferentes tratamientos, día 4. Fotos tomadas por <i>Palma et al. 2021</i>	36
Figura 7	Gráfica comparativa del porcentaje de células TRAP + con los diferentes tratamientos. Diseñada por <i>Palma et al.</i>	36
Figura 8	Evaluación de resorción sobre láminas óseas con los diferentes tratamientos, día 2. Fotos tomadas por <i>Palma et al. 2021</i>	37
Figura 9	Evaluación de resorción sobre láminas óseas con los diferentes tratamientos, día 4. Fotos tomadas por <i>Palma et al. 2021</i>	37
Figura 10	Gráfica comparativa del porcentaje de resorción ósea con los diferentes tratamientos. Diseñada por <i>Palma et al.</i>	38
Figura 11	Evaluación de anillos de actina sobre láminas óseas con los diferentes tratamientos, día 2. Fotos tomadas por <i>Palma et al. 2021</i>	38
Figura 12	Evaluación de anillos de actina sobre láminas óseas con los diferentes tratamientos, día 4. Fotos tomadas por <i>Palma et al. 2021</i>	39

LISTADO DE ABREVIACIONES

μM	Micromolar
Akt	Proteína cinasa B.
AR	Artritis reumatoidea
Ca (OH)₂	Hidróxido de Calcio
CAII	Anhidrasa carbónica II
Cl	Ion cloro
CO₂	Dióxido de carbono
DAPI	4', 6-Diamidino-2-fenilindol
DHE	Indicador de superóxido dihidroetdio
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
gr	Gramo
H₂O	Agua
HCO₃	Ion bicarbonato
IFNγ	Interferón gamma
IL-18	Interleuquina 18
IL-1β	Interleuquina 1 beta
IL-6	Interleuquina 6
IL-8	Interleuquina 8
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
mL	Mililitro
MTA	Agregado Trióxido Mineral
NAC	N- Acetil cisteína
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NFATc1	Factor nuclear de células T activadas 1
NF-$\kappa$$\beta$	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NOX	NADPH oxidasa
OPG	Osteoprotegerina
PBS-EDTA	Solución Salina Taponada con Fosfato EDTA
PEG	Polietilenglicol
PHA	Fitohemaglutinina
RANK	Receptor activador del factor nuclear κ B
RANKL	Ligando del Receptor Activador del factor nuclear
RIPA	Tapón de lisis celular. Del inglés Radioimmunoprecipitation assay buffer
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
SFB al 10%	Suero fetal bovino al 10%
-SH	Grupo sulfhidrilo
SOFAT	Factor osteoclastogénico secretado de células T activadas
TGF-β	factor de crecimiento transformador-beta
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRAP	Fosfatasa acida resistente al tartrato
V/V	Volumen de soluto por cada 100 unidades de volumen de la disolución

RESUMEN

FASE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS DEL POTENCIAL ANTI RESORTIVO DE LA N - ACETILCISTEÍNA (NAC), EL PROPIONATO DE CLOBETASOL Y EL HIDRÓXIDO DE CALCIO EN UN MODELO *IN VITRO* DE CÉLULAS U937

La resorción radicular es una de las mayores preocupaciones en endodoncia. Es importante que el clínico conozca las diferentes opciones de tratamiento, sus repercusiones y probabilidades de éxito para establecer o elegir la información suficiente para optimizar los recursos.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el potencial antiresortivo de la N-acetilcisteína, el propionato de clobetasol y el hidróxido de calcio en un modelo *in vitro* de células U937 fusionadas con PEG. La expresión de ROS, presenta diferencias en los todos tratamientos entre los días 2 y 4, sin embargo, muestra menor intensidad de fluorescencia el tratamiento con hidróxido de calcio, tanto al día 2 como al día 4. Al evaluar la expresión de células TRAP + al día 2 y 4 de cultivo, se evidenció en el día 2 una mayor expresión de células multinucleadas TRAP+ al usar hidróxido de calcio y clobetasol en comparación con los grupos tratados con curcumina y NAC. Al día 4 se puede observar una disminución menor al 50% de las células multinucleadas TRAP+ con todos los tratamientos. En la evaluación del porcentaje de resorción ósea, al día 4 se observa que NAC presenta una mejor actividad antiresortiva que el hidróxido de calcio, aunque no de manera significativa. En cuanto a la formación de anillos de actina, en los grupos tratados con clobetasol hay menos desorganización de los anillos de actina, seguido de los grupos tratados con NAC e hidróxido de calcio.

Al evaluar los perfiles de biocompatibilidad y eficacia del uso de la NAC, el propionato de clobetasol y el hidróxido de calcio en un modelo *in vitro* de células U937 fusionadas con PEG sobre láminas de hueso, observamos que los nuevos medicamentos propuestos tienen una importante capacidad antiresortiva al disminuir la osteoclastogénesis y la actividad de las células osteoclasticas maduras y este mecanismo se mantiene en el tiempo; por lo que pueden ser beneficiosos en el manejo de diferentes procesos patológicos perirradiculares. Sugerimos evaluar la capacidad de difusión de los materiales evaluados a través de la dentina, y su papel amortiguador para determinar su potencia antiresortiva al ser utilizados como medicamentos intraconductos.

Palabras clave: N acetilcisteina - Anti resortivo – Clobetasol – Células U937 – Hidróxido de calcio

ABSTRACT

EXPERIMENTAL PHASE AND RESULTS OF THE ANTIRESORPTIVE POTENTIAL OF N-ACETYLCYSTEINE (NAC), CLOBETASOL PROPIONATE AND CALCIUM HYDROXIDE IN AN *IN VITRO* MODEL OF U937 CELLS.

Root resorption is a major concern in endodontics. It is important for the clinician to be aware of the different treatment options, their repercussions and probabilities of success in order to establish or choose sufficient information to optimize resources.

The aim of this study was to evaluate the antiresorptive potential of N-acetylcysteine, clobetasol propionate and calcium hydroxide in an *in vitro* model of PEG-fused U937 cells. ROS expression, evaluated as Mean Fluorescence Intensity, shows differences in the different treatments between days 2 and 4, however, the calcium hydroxide treatment shows lower fluorescence intensity, both at day 2 and day 4. When evaluating the expression of TRAP+ cells at day 2 and 4 of culture, a higher expression of TRAP+ multinucleated cells was evidenced at day 2 when using calcium hydroxide and clobetasol compared to the groups treated with curcumin and NAC. At day 4 a decrease of less than 50% of TRAP+ multinucleated cells can be observed with all treatments. In the evaluation of the percentage of bone resorption, at day 4 it is observed that NAC presents a better antiresorptive activity than calcium hydroxide, although not significantly. Regarding the formation of actin rings, in the groups treated with clobetasol there is less disorganization of the actin rings, followed by the groups treated with NAC and calcium hydroxide.

When evaluating the biocompatibility and efficacy profiles of the use of NAC, clobetasol propionate and calcium hydroxide in an *in vitro* model of U937 cells fused with PEG on bone lamellae, we observed that the proposed new drugs have an important antiresorptive capacity by decreasing osteoclastogenesis and the activity of mature osteoclastic cells and this mechanism is maintained over time; therefore, they may be beneficial in the management of different periradicular pathological processes. We suggest evaluating the diffusion capacity of the materials evaluated through dentin, and their buffering role to determine their antiresorptive potency when used as intra-oral drugs.

Keywords: N-acetylcysteine - Antiresorptive - Clobetasol - Osteoclast - U937 cells - Calcium hydroxide

INTRODUCCIÓN

La resorción radicular externa es una de las complicaciones de mayor preocupación en Endodoncia. Una vez diagnosticada, debemos tomar medidas rápidas para detenerla o incluso para prevenirla y, así mismo, mejorar el pronóstico del diente. La resorción radicular se presenta como un proceso fisiológico normal en la dentición temporal durante el proceso de erupción del germen permanente, sin embargo, en la dentición permanente en condiciones normales no debería observarse y cuando se presenta se asocia a condiciones patológicas. La célula protagonista en los procesos de resorción es el osteoclasto. (1)

Ante la presencia de inflamación perirradicular, la resorción se produce esencialmente en el hueso y el aparato de inserción, mientras que la parte apical radicular sufre poco o ningún daño. Se han postulado dos teorías al respecto. Una está orientada a que las células de la vaina epitelial radicular de Hertwig forman una red que impide la resorción y la posterior anquilosis. La otra hipótesis se basa en que el tejido cementoide y la predentina, son matrices esenciales en la resistencia a la resorción. Es necesario continuar indagando sobre los mecanismos biológicos de la resorción radicular externa, para buscar alternativas terapéuticas. (1,2)

En los diferentes intentos para controlar la resorción se ha sugerido el uso de agentes terapéuticos intraconducto como son la pasta Ledermix®, que es la combinación de un antibiótico de la clase de las tetraciclinas y un corticoesteroide y por otra parte el hidróxido de calcio que se sugiere estimula la formación de un tejido biomineralizado sobre la superficie radicular afectada. (3-5)

La superficie radicular ha sido tratada con materiales como el Emdogain®, gel que contiene proteínas derivadas de la matriz del esmalte, en un intento por detener la resorción, sin presentar grandes ventajas frente a otros materiales; *Pierce et al.* en 1987, demostraron histológicamente que el Ledermix® erradicó experimentalmente la resorción radicular inflamatoria inducida. (6)

En la actualidad, existe una variedad de tratamientos terapéuticos en un intento de impedir o detener el avance de la resorción radicular externa en dentición permanente, algunos de ellos usados sistémicamente, y algunos quedan por ser explorados. (2)

En la actualidad, el hidróxido de calcio es muy utilizado en el campo de la endodoncia debido a sus ventajas como su efecto inicialmente bactericida y luego bacteriostático, la promoción de la cicatrización y la reparación, su pH alto que estimula los fibroblastos, neutraliza el pH bajo de los ácidos y es económico y fácil de usar.(7)

Los corticosteroides son derivados farmacológicos de miembros de la familia de los glucocorticoides de las hormonas esteroides, tienen un efecto sobre la resorción radicular por la inhibición de las vías de síntesis de los eicosanoides, y la inhibición sobre las células clásticas. En el área médica la N-Acetilcisteína se utiliza en algunos casos para el control de infecciones de las vías respiratorias asociadas a la presencia bacteriana, tanto de forma planctónica como en biopelículas. (8–10).

Aunque es un compuesto no antibiótico, es de interés para el manejo y tratamiento de patologías endodónticas como los procesos resorptivos por su efecto antiinflamatorio, antioxidante y antimicrobiano, por su ya demostrada eficacia contra la formación de biopelículas en una variedad de bacterias grampositivas y gramnegativas. La N-acetilcisteína (NAC) es uno de los compuestos antioxidantes más comúnmente utilizados para disminuir el estrés oxidativo, permitiendo su posible aplicación en la clínica para inhibir la resorción ósea. Además, este medicamento presenta una ventaja sobre el hidróxido de calcio al no perder sus propiedades antibacterianas al tener contacto con la dentina. (11–13)

MARCO TEÓRICO

Osteoclasto

Kolliker en 1873 describe los osteoclastos y propone inicialmente el término de ostoklast para aquellas células multinucleadas, móviles, que tienen su superficie activa una estructura que se describe en la literatura como borde en cepillo para la superficie en contacto con el tejido óseo, dentina o cemento, allí genera la conocida laguna de resorción, es una célula de gran tamaño (85 a 100 micras aproximadamente), puede incluir hasta 10 núcleos, cobra una significativa importancia en el metabolismo óseo a través de los mecanismos de resorción y en procesos como crecimiento y desarrollo, movimiento dental, oseointegración, injertos y reparación de fracturas, en el remodelado óseo de estructuras de interés como maxilares y viscerocráneo, entre otros. (14–16)

En cuanto a la estructura general del osteoclasto se reconocen 3 regiones específicas: zona clara o zona de sellado, borde festoneado o en cepillo y la zona basolateral. (15,17,18)

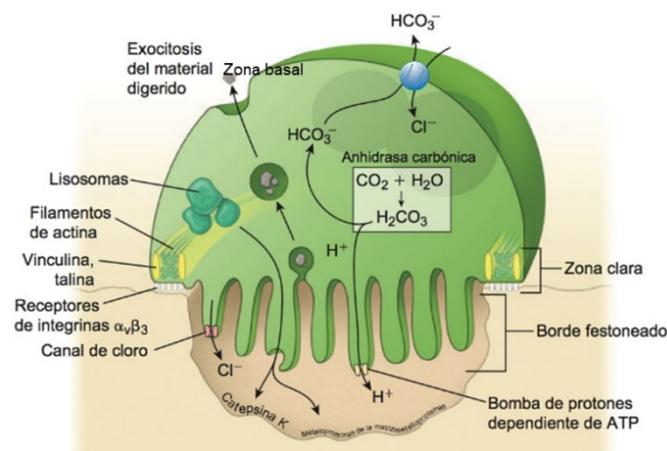


Figura 1 Osteoclasto. Imagen tomada de <https://loshumerouno.wordpress.com/histologia-del-hueso/celulas-del-tejido-oseo/osteoclastos/> y modificada por Palma et al.

1. **Zona clara o zona de sellado:** Está contigua al borde en cepillo, encierra la superficie biomineralizada que será resorbida. Está conformada por unas protuberancias celulares de $1\mu\text{m}$ de ancho y $0.6\mu\text{m}$ de alto llamadas podosomas que permiten la interacción célula-MEC. Contiene abundantes microfilamentos de actina que se hallan organizados en una estructura anular (anillo de actina) rodeada por proteínas de unión como la vinculina y talina. En esta zona existen moléculas de adhesión célula – matriz extracelular (MEC) que forman el anillo de sello entre la membrana celular y la matriz ósea biomineralizada. Varias clases de

receptores están presentes para mantener esta unión: integrinas como $\alpha v \beta 3$ que reconoce proteínas en la matriz ósea que contienen el dominio RGD como la vitronectina, osteopontina, sialoproteína ósea, fibronectina, fibrinógeno y factor Von Willebrand, la integrina $\alpha 2 \beta 1$ que se une al colágeno tipo I. Al interior de esta zona se forma el borde festoneado o borde en cepillo.

2. **Borde festoneado o en cepillo:** Es la porción del osteoclasto en contacto directo con el hueso; contiene muchos pliegues profundos de la membrana plasmática que forman estructuras de tipo microvellosidades, esta es una zona altamente permeable encargada de la exocitosis de las enzimas hidrolíticas, proteolíticas y la secreción de protones por las bombas dependientes de ATP, de igual manera estos repliegues también favorecen la endocitosis de los productos orgánicos e inorgánicos resultado de la degradación ósea. En el citoplasma cerca del borde festoneado hay una gran cantidad de mitocondrias y lisosomas, los núcleos se ubican generalmente en la parte más alejada de la superficie ósea.
3. **Zona basolateral:** Interviene en la exocitosis del material digerido, las vesículas de transporte con material óseo degradado se fusionan con la membrana celular para liberar su contenido al medio extracelular. (14,15,17,18)

El origen del osteoclasto no es totalmente claro, se han planteado varias teorías, algunas de ellas son: la primera entre 1949 al 1970 que el osteoclasto y el osteoblasto tenían el mismo linaje, los osteoblastos se fusionaban para formar el osteoclasto, y viceversa cuando en ciertas ocasiones el osteoclasto se dividía para formar osteoblastos y estos formaban el osteocito; posterior a esto 1970 se propone la teoría bifiletica, en donde se plantea que los osteoblastos y osteoclastos tenían diferente linaje y finalmente para inicio de los 80 se reconoció al sistema fagocito-monocítico como precursor del osteoclasto, aceptándose su origen como hematopoyético, derivando entonces de “Unidades formadoras de colonias de granulocito-macrófagos” (CFU – colony-forming unity), así mismo precursoras de monocitos y macrófagos derivados inicialmente de la estirpe celular hematopoyética comprometida con la línea mieloide; son estimulados por ligandos como el RANKL, marcador de actividad y proliferación de osteoclastos, también se plantea la inhibición de estos tanto en actividad como en cantidad por las OsteoProteGerinas (OPG) producidas por fibroblastos, osteoblastos, osteocitos y células de tejido conectivo próximos al hueso. (14,15)

Sin embargo, gracias a los recientes avances y conocimiento de plasticidad celular, reconociéndose otros orígenes como es recientemente aceptado, y aún más popularizado por el premio Nobel de fisiología y medicina en 2012 Sir John B. Gurdon (por su trabajo en el año 1962), y otros autores como Shinya Yanamaka (por su trabajo en 2006), los cuales demostraron que las células maduras pueden reprogramarse a células pluripotenciales, generando el concepto de dediferenciación, y a partir de esta condición la célula toma una línea para diferenciarse nuevamente en la célula para la cual se está generando algún estímulo o mediador, y todo esto dependiendo de la necesidad del sistema, quedando entonces la posibilidad de grandes adelantos, al no limitar los linajes celulares a determinados órganos, por lo tanto, la plasticidad celular evidencia el potencial genético que mantienen todas las células nucleadas del cuerpo, aun incluso aquellas totalmente diferenciadas o maduras, gracias a la información presente en el material genético, del cual toda célula cuenta con un juego en su núcleo, abriendo grandes posibilidades al campo científico y eliminando limitaciones conceptuales de gran importancia con las cuales se habían desarrollado los conceptos de diferenciación hasta ese momento, ahora debemos abrir la mente a una gran cantidad de posibilidades antes inconcebibles desde la biología y genética para cualquier célula nucleada. (19-22)

Resorción ósea

El término resorción ósea puntualmente hace referencia a la pérdida de sustancia de cualquier tejido mineralizado, sea este hueso, cemento, dentina o esmalte, mediado por sistemas celulares y humorales propios (23)

La fase resorptiva se inicia con la formación de las llamadas lagunas de Howship (áreas de resorción) y termina con la apoptosis de los osteoclastos. Los osteoclastos reabsorben el hueso en dos fases: primero solubilizan el mineral y luego digieren la matriz orgánica. (17)

Durante el proceso de resorción ósea la estructura inorgánica constituida por hidroxiapatita es degradada, seguida por la degradación de la parte orgánica del hueso formada en su mayoría por colágeno tipo 1 (>90%) y proteínas no colágenas. La desmineralización del hueso se produce por la acidificación del microambiente extracelular, este proceso es mediado por los protones secretados por la H⁺-ATPasa vacuolar localizada en el borde de cepillo debido a un abundante transporte de protones

por un intercambiador independiente de energía ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$) sobre la superficie opuesta al borde de cepillo del osteoclasto. La anhidrasa carbónica II (CAII) a partir de CO_2 y H_2O genera HCO_3^- favoreciendo el aumento de Cl^- intracelular y posterior transporte a la laguna de resorción. El resultado de este transporte de iones favorece la actividad del HCl (ácido clorhídrico) que es lo que disuelve la hidroxiapatita; en este microambiente ácido se suman enzimas líticas como TRAP y CATEPSINA K. La catepsina K es una proteasa cisteína que hidroliza el tropocolágeno. Las catepsinas D, B y L degradan a glicoproteínas como la osteocalcina y osteonectina. Así mismo, ácidos como el cítrico y el láctico, liberados por las vesículas secretoras y por las mitocondrias son expulsados en la laguna de resorción a través del borde de cepillo, en donde disuelve las sales óseas y produce lisis del hueso en forma de cavidades formando túneles que pueden llegar a tener entre 100 y 500 μM de largo. Los productos del desarrollo de las lagunas, entran a la circulación: calcio, fósforo y aminoácidos constituyentes de las proteínas óseas principalmente del colágeno, especialmente prolina e hidroxiprolina, que a la vez van a estimular la calcitonina y la PTH de acuerdo con la concentración del calcio iónico sérico; estos productos metabólicos son utilizados como marcadores biológicos de resorción ósea. (15,18,24–27)

RANK – RANKL- OPG

Para que el osteoclasto inicie su función resorptiva, debe ser activado por el RANKL (ligando para el receptor activador del factor nuclear $\kappa\beta$), molécula principal producida por los osteoblastos, las células del estroma, los linfocitos T, fibroblastos entre otras. Los efectos del RANKL están mediados por su unión a un receptor altamente específico, el RANK (El receptor activador del factor nuclear $\kappa\beta$), una proteína transmembrana expresada por los osteoclastos, preosteoclastos y monocitos. La unión del RANK con su ligando RANKL, induce la activación de una cascada de eventos intracelulares que llevan a la diferenciación y activación de los osteoclastos. (14,15,24,28–30)

Las células T son una fuente importante de RANKL, experimentos *in vitro* e *in vivo* demuestran que la activación de células T conlleva al incremento en osteoclastogénesis y resorción ósea. Sugiriendo que los estados inflamatorios agudos y crónicos, al igual que ciertas leucemias, contribuyen con pérdida patológica de masa ósea mediada por osteoclastos. (24,31,32)

El RANKL tiene un inhibidor competitivo que inhibe su unión al ligando RANK, denominada osteoprotegerina (OPG), miembro de la superfamilia de receptores del TNF segregado por los osteoblastos no anclados a la membrana. Actúa como señuelo uniéndose al RANKL y neutralizándolo (receptor trampa), impide su unión con el RANK, inhibe la diferenciación, supervivencia y fusión de los precursores de osteoclastos, bloquea la activación de los osteoclastos maduros e induce su apoptosis. Sin embargo recientemente una nueva citoquina producida por las células T, denominada SOFAT (por sus siglas en inglés Secreted osteoclastogenic factor of activate T Cell), evaluado en monocitos de ratón de la línea RAW 264.7 demostraron que al ser estimulados con SOFAT, expresan marcadores osteoclastogénicos como integrina $\alpha\beta3$, capticina K y anillos de actina aun cuando dichas células se estimulan simultáneamente con OPG, demostrando que esta citoquina estimula la formación de células similares a osteoclastos y no está mediada por RANKL. (24,32)

Dai et al., plantean que la interleukina 18 (IL-18) directa o indirectamente tiene efectos osteoclastogénicos mediado por células T en Artritis Reumatoide (AR) sinovial. Compararon sus efectos con la incorporación de IL1 β y TNF α . Esta investigación concluye que en presencia de PHA la cual pre estimulaba las células T o células T sinoviales de AR, IL18, IL1 β , o TNF α incrementaba el RANKL soluble, la expresión de RANKL membranal en una relación dosis dependiente. Pero no induce la expresión de M-CSF, GM-CSF, IFN γ u OPG. Indicando, además, que puede estimular la producción de osteoclastos a través de la sobre regulación de RANKL en las células T AR sinoviales. (24,33)

Resorción radicular

La resorción radicular en la dentición permanente es un proceso patológico que puede ocurrir después de varias lesiones, incluidas lesiones mecánicas, químicas, térmicas o de origen bacteriano, se puede dar tanto en el interior del diente (resorción interna derivada de la pulpa) o en la superficie externa del diente (resorción radicular externa derivada del periodonto). (34).

La resorción radicular externa se presenta cuando no se produce un equilibrio entre la activación osteoblástica y osteoclástica que mantienen el estado fisiológico de la raíz del diente resultando en la destrucción de dentina, cemento y hueso. El daño a la capa de cemento radicular debido a la presencia de endotoxinas y mediadores inflamatorios que

actúan como quimioatrayentes para osteoclastos puede reabsorber la dentina adyacente a esta zona produciendo un medio ácido que favorece este proceso patológico. Se ha propuesto una clasificación en tres subgrupos: resorción de superficie; resorción inflamatoria y resorción por reemplazo; esta clasificación se basó en su apariencia clínica e histológica posterior a lesiones traumáticas. Diferentes estudios han propuesto una categoría de resorción radicular llamada resorción hiperplásica cervical invasiva, la cual ha demostrado ser de origen interno o externo y los factores potenciales predisponentes de esta condición incluyen trauma, tratamiento ortodóntico y aclaramiento intracoronal. También hay algunas resorciones dentarias que no encajan en ninguna de las categorías nombradas, por lo que se las considera idiopáticas.(34–39)

La resorción radicular externa es un proceso patológico y una complicación frecuente de una lesión traumática en el diente. (40)

Tiende a ocurrir con mayor frecuencia en los pacientes entre 21 y 30 años de edad (28,40%) y es más común en mujeres (59,04%) que en hombres. Este proceso patológico puede tener diferentes causas como infección pulpar o periodontal; dientes impactados, por presión de un tumor o por movimientos ortodónticos, especialmente cuando las fuerzas aplicadas para inducir el movimiento de los dientes no están controladas y en estas situaciones la resorción por lo general ocurre en el tercio apical de la raíz. (36,37,39)

En el caso del trauma dentoalveolar, se ha reportado que el rango de resorción inflamatoria difiere, dependiendo del tipo de luxación. En la luxación extrusiva es de un 5.6%, en la luxación lateral de un 11.6% y en la luxación intrusiva de 33.3%. Seguidas de la avulsión y reimplantación, la incidencia de resorciones inflamatorias activas diagnosticadas fue de 26.5%, mientras que la anquilosis y resorción por reemplazo fue de 42.9% (41)

El diagnóstico debe basarse en una combinación de exámenes radiográficos y clínicos. Las radiografías intraorales de la lesión suelen mostrar una superficie irregular de la raíz. Las radiografías obtenidas en diferentes angulaciones pueden ser útiles para determinar la superficie que se encuentra afectada. La tomografía computarizada se ha considerado como la herramienta más precisa para detectar la resorción radicular. (42,43)

Clínicamente, la resorción radicular externa podría estar asociada con inflamación periodontal y formación de bolsa periodontal; aunque esta condición es generalmente

asintomática y no es tan fácil su diagnóstico, la resorción radicular externa puede resultar en la movilidad dental y, si no es diagnosticado y tratado en una fase temprana, con el tiempo puede resultar en la pérdida dental. (39)

Las alternativas de tratamiento dependen del tipo y el alcance de la resorción y puede incluir un tratamiento para el alivio de la sintomatología, inflamación y la ferulización de los dientes con movilidad si es necesario. Si hay afección en el tejido pulpar, la terapia endodóntica, o la cirugía apical para eliminar el tejido granulomatoso junto con una obturación del defecto de la resorción es recomendada. Los medicamentos intraconducto y cementos bioactivos tales como el MTA, han sido utilizados para tratar de detener el proceso de resorción y proporcionar un selle apical en el diente. Si se ha producido como resultado de la presión de un diente no erupcionado o por la erupción de dientes o durante el tratamiento de ortodoncia y no hay signos de infección, la remoción del diente o de la presión generalmente detendrá la resorción radicular. (36,44,45)

Otras alternativas terapéuticas incluyen la extirpación pulpar y el uso de medicamentos intraconductos antirresortivos como el hidróxido de calcio, corticoides, pasta antibiótica (tetraciclinas) para intentar detener la resorción radicular. Cuando la pulpa de los dientes inmaduros avulsionados se necrosa, las opciones de tratamiento son limitadas y el pronóstico es reservado debido a la dificultad de instrumentación, paredes dentinales delgadas dejando el diente débil y propenso a la fractura. Muchos estudios han demostrado in vivo que es posible desinfectar dientes permanentes inmaduros y permitir la cicatrización de la resorción radicular inflamatoria usando combinaciones de pastas antibióticas. Finalmente, una excelente restauración y selle son importantes para el éxito del tratamiento. Materiales tales como amalgama, resina compuesta, ionómero de vidrio, y MTA se han utilizado para este propósito. (34–36,38)

Células U937

La línea U-937 fue la primera línea celular de naturaleza monocítica en ser caracterizada; fue derivada a partir de células cancerosas obtenidas de la efusión pleural de un paciente con linfoma histiocítico en 1974; sin embargo, estas células poseen características morfológicas e inmunohistoquímicas que las definen como monocitos (Drexler, 2002, Harris and Ralph, 1985). Cuando las células de la línea U-937 son inducidas a diferenciación en un medio con presencia de factores asociados a linfocitos activados,

sufren una serie de cambios morfológicos y funcionales tales como aumento de tamaño, aparición de lóbulos en el núcleo y proyecciones citoplasmáticas, mayor número de lisosomas y fagosomas, mayor expresión de receptores Fc en su superficie y capacidad de adherencia (Larrick et. al., 1980, Harris and Ralph, 1985). Gracias a estos cambios, las células son capaces de responder a diferentes clases de quimoquinas, producir radicales superóxido, aumentar la liberación de enzimas lisosomales y su actividad fagocítica y realizar citólisis dependiente de anticuerpos, características propias de los macrófagos. Entre los principales agentes inductores de diferenciación de las células U-937 se cuentan los sobrenadantes de cultivos mixtos de linfocitos humanos, ésteres de forbol, vitamina D3, ácido retinoico y forskolina. (46)

Modelo para generar células con actividad osteoclástica

Se ha definido la actividad y conceptos en relación con los osteoclastos, así como la plasticidad celular para la desdiferenciación con la connotación de que toda célula tiene el potencial de, ante un estímulo, generar otra diferente o expresar fenotípicamente funciones para las que inicialmente no estaba programada, todo esto en realidad obedece a un adecuado estímulo, entonces, podríamos identificar mecanismos para inhibir funciones, de forma local o para limitarlas, tendiendo control sobre la actividad de la célula y con ello plantear controles para patologías, disminuyendo su evolución o eliminándolas. (20)

En el laboratorio de biología molecular de virus en la facultad de medicina de la Universidad Nacional de Colombia bajo la dirección del Profesor Carlos Arturo Guerrero Fonseca se ha generado un modelo con actividad resortiva consistente en fusionar células de origen monocito-macrófago de las líneas U937/A and J774 de ratón o células mononucleares de sangre periférica (CMNSP) humanas, e incluso fibroblastos de origen mucosa palatina, químicamente con polietilenglicol (PEG). El mismo laboratorio determinó que al someter células de estas líneas a fuerza centrífuga desarrollaban actividad osteoclástica tanto resortiva como la expresión de marcadores propios de osteoclastos. Esto trae la posibilidad de evaluar su actividad resortiva sobre el hueso, en un modelo que es de fácil reproducción y de menor costo comparado con el estímulo hormonal o de modelos comerciales. (19)

Adicionalmente *Wei et al.*,(2008) reportaron que el efecto de las fuerzas centrífugas en cultivos de fibroblastos de ligamento periodontal tiene el potencial de desarrollar expresión de actividad osteoclástica. (47)

En un estudio de *Lorenzo et al.*, (1987) utilizando PHA (fitohemaglutinina) como estimulador de CMSP junto con IL-1 recombinante, y TNF α , mostró que el efecto de PHA favorece la síntesis local de IL-1 y ésta medía la actividad resortiva, concluyendo que las citoquinas se encuentran en la circulación de individuos normales y se producen en los sitios localizados de diversas patologías, ante estímulos como lesiones, o en cualquier proceso inflamatorio, sugiriendo que puede influenciar el metabolismo esquelético normal o anormal. (48)

Kotake a partir de células obtenidas de reemplazos articulares en pacientes con artritis reumatoidea concluye que la PHA activa las células T humanas expresando RANKL la cual induce osteoclastogénesis de monocitos periféricos autólogos, los cuales pueden ser bloqueados por inhibición dosis dependiente de OPG y que en general se observa un aumento en la expresión de RANKL en las células de pacientes con Artritis reumatoidea (48).*Weitzmann et al.*, encontraron que la PHA activa células T CD4+ y CD8+ humanas y estimula la formación de osteoclastos *in vitro* por RANKL. (49)

Hidróxido de Calcio

En 1920, Herman introdujo el hidróxido de calcio en la odontología como material de recubrimiento pulpar, pero hoy en día se utiliza ampliamente en el campo de la endodoncia. Es un polvo blanco inodoro con la fórmula química Ca (OH) 2 y un peso molecular de 7,08. Químicamente, se clasifica como una base fuerte y en contacto con el agua (su pH es de aproximadamente 12,5 - 12,8), se disocia en iones de calcio e hidroxilo. (7)

El CaOH₂ se utiliza y se suministra en diversas formas: como cemento cuando se suministra como un líquido que contiene hidróxido de calcio suspendido en un disolvente o cuando se suministra como una pasta en la que se suspende hidróxido de calcio en metilcelulosa. Otra presentación se comercializa como base y catalizador. Al usar el catalizador, el hidróxido de calcio reacciona más rápido y forma un compuesto amorfo duro en cuestión de minutos en el ambiente oral. (7)

En la actualidad, el hidróxido de calcio es muy utilizado en el campo de la endodoncia debido a sus ventajas como su efecto inicialmente bactericida y luego bacteriostático, la promoción de la cicatrización y la reparación, su pH alto que estimula los fibroblastos, neutraliza el pH bajo de los ácidos y es económico y fácil de usar. (5,7,9)

Con respecto a su papel en la resorción, el hidróxido de calcio alcalino neutraliza el ambiente ácido que existe en la región de resorción, invirtiendo la reacción y estimulando así la formación de tejido duro. La difusión de iones hidroxilo liberados por el hidróxido de calcio a través de los túbulos dentinarios que se comunican directamente con el espacio periodontal aumentaría el pH del espacio periodontal de 6,0 a 7,4 - 9,6. Para tratar una resorción interna, el canal y la laguna de resorción se rellenan con pasta de hidróxido de calcio. De esta forma el hidróxido de calcio inducirá el proceso de necrotización del tejido remanente en la laguna, y luego mediante irrigación con hipoclorito de sodio se eliminan los residuos necróticos. En caso de resorción lateral, la extirpación pulpar, el desbridamiento del conducto radicular y la aplicación de hidróxido de calcio son una alternativa terapéutica. El defecto de resorción debe rellenarse con hidróxido de calcio a intervalos de 3 meses hasta que revele la formación de tejido duro, confirmada tanto por el examen directo a través de la cavidad de acceso como por la radiografía. Una vez establecida la barrera física, el defecto se puede compactar con gutapercha. (5,7,9)

Por otro lado, el hidróxido de calcio tiene algunas desventajas: no estimula exclusivamente la dentinogénesis, estimula exclusivamente la dentina reparadora, asociado con la reabsorción dental primaria, puede disolverse después de un año, se degrada al flexionar los dientes, fallo marginal con condensación de amalgama, no se adhiere a la restauración de la dentina o la resina. (5,7)

Engström en 1958 y Messer & Chen en 1984, indican que se sabe poco sobre la inactivación de medicamentos en el conducto radicular debido posiblemente a la dificultad de completar tales experimentos in vivo y la falta de modelos *in vitro* adecuados. Sin embargo, recientemente diferentes autores han demostrado que el hidróxido de calcio presenta inactivación de su propiedad antimicrobiana al contacto con la dentina. (7,9,12,50-52)

Panzarini (2012) señala que, a pesar de sus excelentes propiedades biológicas, el hidróxido de calcio tiene algunas otras desventajas, como la larga duración del

tratamiento, la necesidad de recambios y el debilitamiento de la estructura dental después de una terapia intracanal prolongada, y que en estudios en dientes de monos se ha sugerido que el hidróxido de calcio aumenta el riesgo de anquilosis en dientes permanentes con daño severo del ligamento periodontal o en caso de extravasación accidental a la región periapical, por su efecto relativamente tóxico que induce necrosis celular cuando las células (tanto las resortivas como las reparadoras) entran en contacto con él, como reporta Lengheden en varios estudios y *Bryson et al.* en 2002. (4,9,38)

Propionato de clobetasol

El propionato de clobetasol es un esteroide sintético tópico de alta potencia, análogo a la prednisolona, con efectos antiinflamatorios, antipruriginosos y antiproliferativos. Los corticoesteroides fueron descubiertos en 1935, son usados para el tratamiento de numerosos padecimientos, como osteoartritis, artritis reumatoidea y lupus eritematoso sistémico. Son absorbidos en el tracto gastrointestinal y tienen metabolismo hepático y excreción renal. La administración de estos puede darse por vía oral, intravenosa, intramuscular, intraarticular, aerosol y en presentación tópica. (10,53)

Las acciones de los corticosteroides se producen en el interior de la célula, donde se unen a receptores específicos. Una vez enlazados al receptor, migran hacia el núcleo, uniéndose a un sitio específico del DNA, originando la respuesta antiinflamatoria, antiproliferativa y antipruriginosa. La acción antiinflamatoria se puede dar por varios medios: 1. La reducción del número y activación de eosinófilos, desencadenando la apoptosis de los mismos y disminuyendo algunos de sus factores quimiotácticos, que incluyen las IL-3, IL-5, GM-CSF (Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos), entre otros. 2. Reducción de la proliferación de linfocitos T e inducción de la apoptosis de los mismos, al disminuir la acción de la IL-2. 3. Producción y liberación de proteínas como la lipocortina, que actúan inhibiendo la liberación de fosfolipasa A2, disminuyendo el aporte de ácido araquidónico para las vías de la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa y, por ende, la producción de prostaglandinas y leucotrienos. La acción antiproliferativa se lleva a cabo al inhibir la síntesis de DNA y la mitosis de varios tipos celulares, evitando la diferenciación de fibroblastos, producción de colágeno, tejido de granulación, tejido conectivo y retarda el proceso de cicatrización. (8,10)

Pocos estudios muestran el efecto de los corticosteroides sobre la reparación de los tejidos periodontales en los dientes reimplantados. *Kirakozova et al.*, investigaron el potencial de los corticosteroides intracanal (0.05% clobetasol y 0.05% fluocinonida) en la reparación periodontal de dientes avulsionados y evaluó la absorción sistémica de los mismos. Aunque los esteroides en general suprimen la inflamación al inhibir todas las vías de síntesis de eicosanoides, se ha demostrado que el componente esteroide de la pasta Ledermix®, triamcinolona al 1%, tiene un efecto inhibitorio directo sobre las células clásticas. Adicionalmente, que el corticosteroide en la misma dosis que el que se encuentra en el Ledermix® como medicamento intracanal fue tan efectivo como el propio Ledermix® para inhibir la resorción radicular inflamatoria externa y promover la cicatrización favorable, eliminando así el efecto secundario de la decoloración de los dientes. (8)

A su vez *Panzarini et al.*, en 2012, concluyeron que aquellos dientes mostraron una reparación significativamente mayor que aquellos obturados con gutapercha y cemento de Roth. (9)

Lo descrito anteriormente es la base teórica que permite sustentar el uso de propionato de clobetasol en nuestro proyecto y su posible aplicación en la clínica para inhibir la resorción ósea.

Ledermix®

También se ha sugerido, por muchos años, el uso de pasta Ledermix® para el tratamiento de dientes avulsionados. Esta es un compuesto de acetónido de triamcinolona y demetilclortetraciclina en crema soluble en agua (corticoide más tetraciclina), del cual se ha reportado que posee teóricamente el efecto terapéutico tanto de la tetraciclina como de los corticosteroides. Por un lado, ya sabemos que los esteroides en general suprimen la inflamación al inhibir todas las vías de síntesis de eicosanoides, y se ha demostrado que la triamcinolona al 1%, tiene un efecto inhibitorio directo sobre las células clásticas; por otro lado, se ha demostrado que la tetraciclina posee un efecto antimicrobiano contra una amplia gama de bacterias grampositivas y gramnegativas y una propiedad antirresortiva, y forma un enlace relativamente fuerte y reversible con el tejido dental duro, exhibiendo una liberación lenta durante un período prolongado de tiempo; la acción sinérgica de estos dos medicamentos y la difusión lenta a través de la dentina dan como resultado el

control de la respuesta inflamatoria inicial al reducir la contaminación bacteriana de la superficie radicular e inhibir la colagenasa, así como las actividades osteoclásticas, minimizando la resorción del aparato de inserción, facilitando la regeneración periodontal (3,4,8). Abbot (2016) recopila que, previamente, se ha sugerido realizar el recambio de este medicamento cada 4 semanas en dientes sin formación radicular completa, y cada 6 semanas para dientes con formación radicular completa, ya que después de este tiempo el componente activo que se va liberando es inferior a sus niveles terapéuticos. (2,38)

El Emdogain® también ha sido utilizado para tratar la superficie radicular, sobre todo en Periodoncia. Es un derivado de la matriz del esmalte extraído del desarrollo del esmalte embrionario de origen porcino, contiene proteínas de la familia de las amelogeninas (constituyente hidrofóbico de las proteínas de la matriz del esmalte). Se dispensa como una solución acuosa esterilizada de alginato de propilenglicol. Se desconoce el mecanismo de acción preciso de Emdogain®, pero los estudios *in vitro* han demostrado que influye en la migración, la unión, la capacidad proliferativa y la actividad biosintética de las células del ligamento periodontal. Lo que sí se ha demostrado es que mejora la proliferación de células del ligamento periodontal y la producción de proteínas, además de promover la formación de nódulos minerales por parte de las células del ligamento periodontal. Además, puede actuar como una matriz para las células responsables de regenerar el ligamento periodontal en el sitio de una herida. (2,54)

N- acetilcisteína (NAC)

La N-acetilcisteína es un antioxidante vegetal encontrado sobre todo en plantas de la especie *Allium*, especialmente en la cebolla (*Allium cepa* , 45 mg NAC / kg) y es considerado seguro, incluso en grandes dosis; se ha utilizado como medicamento desde la década de 1960 en algunos casos para el control de infecciones de las vías respiratorias asociadas a la presencia bacteriana, el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, las infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), la toxicidad de los metales y figura en la Lista Modelo de Medicamentos Esenciales de la Organización Mundial de la Salud (OMS) como antídoto en la toxicidad hepática inducida por paracetamol. La N-acetilcisteína se caracteriza por su eficacia antioxidante, mediada tanto por efectos directos como indirectos. Es un precursor del aminoácido L-cisteína (Cys) y, en consecuencia, del antioxidante glutatión (GSH). (55,56)

En el campo odontológico, aunque es un compuesto no antibiótico, es de interés para el manejo y tratamiento de patologías endodónticas como los procesos resorptivos por su efecto antiinflamatorio, antioxidante y antimicrobiano, ya que se ha demostrado que reduce eficazmente la formación de biopelículas en una variedad de bacterias grampositivas y gramnegativas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* entre otras. (12,13)

El glutatión es el antioxidante endógeno más abundante en los organismos vivos, constituido por los aminoácidos glutamato, cisteína y glicina (tripéptido) y juega un papel crucial en la protección intracelular contra compuestos tóxicos, como ROS y otros radicales libres, en una reacción catalizada por la Glutatión peróxidasa (GPx). NAC ejerce su efecto antioxidante, gracias a que en un proceso metabólico es convertida en cisteína, la cual estimula la síntesis del glutatión. Además, la NAC tiene su grupo sulfhidrilo (-SH) libre y es un donador de H y por tal es un eficaz agente reductor. Frena las reacciones oxidativas que pueden tener lugar e impide la oxidación de importantes moléculas estructurales y funcionales y el comienzo de lesiones por radicales libres. Penetra en células y a través de sus reacciones subsiguientes se transforma en Glutatión reducido. (12,57)

El grupo sulfhidrilo (-SH) dentro de la molécula de NAC elimina directamente las especies reactivas de oxígeno (ROS), modula el estado redox del N-metil-D-aspartato (NMDA) y receptores del ácido α -Amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol (AMPA) (efecto neurotransmisor), e inhibe el factor nuclear kappa-potenciador de la cadena ligera de las células B activadas (NF- κ B) para modular la síntesis de citocinas (efecto anti / proinflamatorio). (55)

El ligando RANKL (factor nuclear kapa β) es esencial para la diferenciación y activación del linaje monocito-macrófago (BMM) a osteoclastos. Se ha demostrado que el RANKL estimula las células BMM transitoriamente aumentando el nivel intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de una cascada de señalización que implica TNF (factor de necrosis tumoral) receptor del factor asociado (TRAF), Rac1, y NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) NADPH oxidasa (Nox), esto puede causar un desequilibrio celular en las reacciones de reducción-oxidación y alterar las funciones biológicas normales, lo que lleva al estrés oxidativo, el cual es una causa importante de senescencia celular ya que puede causar daños en el DNA. El aumento del estrés oxidativo

y la producción elevada de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) afectan el metabolismo óseo a través de varios mecanismos. Estas citocinas proinflamatorias y el estrés oxidativo son capaces de estimular la diferenciación y activación de los osteoclastos, y las especies reactivas de oxígeno (ROS) estimulan directamente la formación y actividad de los osteoclastos e inducen la apoptosis de osteoblastos y osteocitos, lo que conduce a la resorción ósea. (16,58,59)

Restaurar las defensas antioxidantes mediante la administración de N-acetilcisteína (NAC) bloquea la actividad de Nox (NADPH oxidasa), proteína que conduce a la formación ROS, inhibiendo la respuesta de las células a BMM al RANKL, incluyendo disminución en la producción de ROS, la activación de la quinasa c-Jun N-terminal (JNK), proteína quinasa activada por mitógeno p38 (MAPK), la señal extracelular-quinasa regulada (ERK), y la diferenciación, fusión y funciones de los osteoclastos, lo que inhibe la resorción radicular. (16,58–60)

En un estudio llevado a cabo por *Aitken et al.*, se determinó que la expresión diferencial de TBP-2 (proteína de unión tiorredoxina 2) y Trx-1 (tiorredoxina) se produce durante la osteoclastogénesis, que en presencia de RANKL, la expresión de TBP-2 se redujo, mientras que se incrementó Trx-1. El antioxidante N-acetilcisteína revirtió este patrón, aumentando TBP-2 y reduciendo Trx1, con lo cual se inhibió marcadamente la osteoclastogénesis, concluyendo que moduladores del sistema Trx tales como antioxidantes (NAC) tienen potencial como terapias antirresortiva. (31)

En cuanto a la actividad antiinflamatoria, la NAC se asocia con la disminución de NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas); NAC suprime la ubiquitinación y degradación de I- κ B (un inhibidor de NF- κ B) y, por lo tanto, bloquea la translocación y activación nuclear de NF- κ B. También previene la expresión de citocinas proinflamatorias inducidas por lipopolisacáridos, como la interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6 e IL-8, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y el factor de crecimiento transformante (TGF- β) en macrófagos y fibroblastos. (61)

La N-acetilcisteína (NAC) es uno de los compuestos antioxidantes más comúnmente utilizados para disminuir el estrés oxidativo, permitiendo su posible aplicación en la clínica para inhibir la resorción ósea. además, Este medicamento presenta una ventaja sobre el hidróxido de calcio al no perder sus propiedades antibacterianas al tener

contacto con la dentina (por la capacidad amortiguadora de la dentina) y al destruir con mayor eficacia tanto formas planctónicas como biofilm de *E. faecalis* a un pH de 11, debido a su efecto sobre la producción de exopolisacáridos (principal componente de las biopelículas) a través de la ruptura de los enlaces disulfuro de las enzimas bacterianas involucradas en la producción o excreción de exopolisacáridos a través del intercambio tiol-disulfuro, y por su efecto antioxidante directamente sobre el metabolismo de las células bacterianas y la producción de exopolisacáridos. (12,55,57)

Marcadores propios de osteoclastos

Actualmente la forma más confiable de identificar y diferenciar una célula de otra es con marcadores, como receptores de membrana o expresados por la célula en cuestión, como proteínas o enzimas propias de sus funciones, así entonces se contará con parámetros de diferenciación constantes y confiables para hablar con propiedad de un grupo celular sea cultivado o identificándose de un tejido in vivo. (47,62,63)

Durante el proceso de resorción ósea la disolución de cristales y en general de la matriz inorgánica como fue descrito anteriormente se completa en el interior de vacuolas intracelulares donde fermentos proteolíticos, como la cisteinproteínasa ácida, la catépsina K, las colagenasas y metaloproteinasas neutras, destruyen la fracción orgánica. Los osteoclastos multinucleados y algunos mononucleados (monocitos) con potencial resorptivo son positivos a la fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP), que se usa como su marcador más característico. Otro marcador de los osteoclastos es el receptor de Calcitonina (RCT), es un regulador importante de homeostasis de Ca^{+2} con su acción directa en los osteoblastos que inhiben la actividad de resorción ósea(62,64)

ADAM 12

Es una metaloproteasa y desintegrina, hay más de 30 ADAM identificadas, 4 incluyendo la 12 son proteolíticas importantes, requiere de la presencia de metales como zinc o cobalto para su activación, a nivel óseo se considera también una proteína de anclaje a membrana del osteoclasto para iniciar su actividad resorptiva, catalizando la fusión de células mononucleares para formar macrófagos y también la adhesión de estos al hueso. (62,65,66)

ATPasa

La capacidad de la excavación o resorción del hueso por los osteoclastos se debe al microambiente ácido con un pH de aproximadamente 4.5 entre la zona del borde en cepillo y la zona de sellado, para formar la laguna de resorción ósea, este microambiente es generado por la ATPasa H⁺ vacuolar, la cual acidifica con hidrogeniones la laguna y mantiene el equilibrio de hidrogeniones entre la laguna y el interior de los osteoclastos, es indispensable para la actividad del osteoclasto. (62,67)

Integrina B3

La integrina B3 es una glicoproteína transmembrana que hace parte de los receptores de adhesión, que son los responsables de la interacción del osteoclasto con la matriz extracelular y en el reconocimiento entre las células, regula la motilidad celular y la organización del citoesqueleto para permitir su adhesión o paso a través del endotelio en la diapedesis. Está localizado en la zona de sellado de los osteoclastos, se une a Arg-Gly-Asp (RGD) que contienen proteínas de la matriz extracelular como vitronectina, osteopontina, sialoproteína ósea. Así un integrina puede unirse a varios receptores y estos a su vez unirse a varias integrinas, las integrinas son indispensables para formar la zona de sellado sin la cual no podría ocurrir la resorción ósea. (18,62,68)

DC- Stamp

La DC-stamp o Proteína Dendrítica transmembrana específica, es una proteína transmembrana originalmente identificada en células dendríticas o macrófagos, es estimulada por la IL4. Recientemente, se ha informado que puede inducir la diferenciación de osteoclastos y es inducida por el RANKL, sin embargo, el papel más conocido de DC-STAMP es en la fusión célula-célula y en vivo sigue siendo desconocido. En ratones knockout con deficiencia de DC-STAMP, se demostró el compromiso de la multinucleación de macrófagos y osteoclastos, con lo que se puede demostrar la necesidad de su presencia en la fusión celular y con ello contribuye a posterior producción TRAP. (62,69,70)

Receptor de calcitonina

La calcitonina es una hormona hipocalcémica que es secretada por las células C de la tiroides, sus dos principales objetivos son los riñones y el hueso. La calcitonina potencialmente inhibe la resorción ósea bloqueando la formación y la activación de los osteoclastos. El receptor sensible al calcio (RCa) regula la secreción de PTH y la reabsorción de calcio por los túbulos renales en respuesta a alteraciones en las

concentraciones plasmáticas de calcio. En el RCa normal, la hipocalcemia induce un aumento de la secreción de PTH y la hipercalcemia reduce la secreción de PTH.

El receptor de calcitonina es utilizado frecuentemente para identificar células similares a osteoclastos, este marcador en células de la línea mielomonocítico solo es expresado por los osteoclastos para generar un mecanismo autoregulator de la hipercalcemia. (71,72)

Catepsina K

La cisteín catepsina se encuentra principalmente en los compartimentos ácidos de las células. Su función es de proteasa en la degradación intracelular. De acuerdo con el descubrimiento de nuevas catepsinas como la K, V y F, ha proporcionado evidencia de que también participan en eventos biológicos específicos. La catepsina no es estrictamente lisosómica, las proteasas son transportadas entre fagosomas, endosomas, lisosomas y enzimas. La acidificación del espacio pericelular de los osteoclastos aumenta la liberación de la catepsina K para promover la proteólisis extracelular. Esta enzima es crucial en la remodelación ósea, en particular en la ruptura de colágeno. (32,33,62)

TRAP

El TRAP (Fosfatasa ácida tartrato-resistente) se considera una enzima casi inexistente en los tejidos humanos, excepto sobre el hueso que expresa gran cantidad y es por los osteoclastos, por eso se utiliza como marcador de osteoclastos, aunque los macrófagos también pueden expresarlo. (62,73)

La enzima TRAP interviene en la degradación de proteínas no colágenas del hueso, sin embargo, las fosfatasa ácidas son enzimas encontradas en todos los tejidos del cuerpo, incluyendo leucocitos humanos; estas enzimas hidrolizan ésteres de mono fosfato en un medio ácido. La TRAP tiene una actividad catalítica en pirofosfatos orgánicos (ATP, ADP), pirofosfato de sodio inorgánico, monofosfoésteres de alcoholes aromáticos (1 naftil fosfato y para-nitrofenilfosfato, considerado como el mejor sustrato para la enzima). La fosfatasa ácida resistente a tartrato es detectable en cerumen fisiológico y circunstancias patológicas asociadas al incremento de la resorción ósea. (62,73)

Hay una correlación entre la expresión de TRAP y el grado de proceso de resorción ósea para los osteoclastos, lo que implica un importante papel de esta enzima en la resorción ósea. Esta afirmación está basada en experimentos en que utilizaron bloqueadores de la enzima y se demostró que la inhibición de esta enzima es acompañada por una marcada

reducción de la resorción ósea. Se cree que al ser esta enzima una pirofosfatasa, es probablemente la responsable de la remoción de pirofosfato, potente inhibidor de la solubilización de la apatita, considerado el primer paso esencial en la resorción. (62,73)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad clínica en endodoncia para el manejo de los procesos resorptivos podemos encontrar diferentes alternativas como el hidróxido de calcio, propionato de clobetasol 0,05%, propionato de clobetasol 0.05% con minociclina y N-acetilcisteína (NAC). (19,24,28,74)

Rutinariamente en endodoncia se usa el hidróxido de calcio, el cual es un polvo blanco que se obtiene por calcinación del carbonato de calcio y su transformación en óxido de calcio. Con la hidratación del óxido de calcio se obtiene el CaOH: $\text{CO}_3 \text{Ca} = \text{CaO} + \text{CO}_2$, $\text{CaO} + \text{H}_2\text{O} = \text{Ca} (\text{OH})_2$; además este polvo granular, amorfo y fino posee marcadas propiedades básicas, su pH es muy alcalino, aproximadamente 12. Su disociación en iones calcio e iones hidroxilo explica su acción sobre los tejidos, posee valiosas cualidades desde el punto de vista biológico, antimicrobiano y mineralizador, pero tiene desventajas como lo son su dureza superficial, corto tiempo de manipulación, disminución de su pH en un tiempo corto, no tiene resistencia compresiva, no posee la capacidad de tener una adherencia al tejido dental, no atraviesa el túbulo dentinal por el tamaño de la partícula y es muy soluble. (5,7)

Para controlar la resorción radicular en endodoncia se usa el propionato de clobetasol al 0,05 % que es un corticoide de uso tópico perteneciente a un grupo de potencia alta entre los corticosteroides. Es de fácil manipulación, y se aplica directamente en el conducto radicular seco empaquetándolo, ya sea con léntulos o con limas endodónticas, su presentación es en crema y un pro es su fácil adquisición, adicionalmente es un medicamento que puede emplearse como medicación intraconducto mezclado con la minociclina, la cual pertenece a una clase de medicamentos llamados antibióticos de tetraciclina. Funciona como tratamiento para infecciones endodónticas al prevenir la multiplicación y la propagación de las bacterias adicionalmente que posee capacidades antiresorptivas, ya que ha demostrado mejores resultados en el tratamiento de la reabsorción radicular externa e interna. Otra de las ventajas del propionato de clobetasol con la minociclina es el bajo costo y fácil aplicación, pero su mayor desventaja es que al aplicarlo con el antibiótico tipo tetraciclina genera pigmentación dentinal. (8-10,53)

Una posible alternativa es el uso de la n-acetilcisteína (NAC) que tiene como ventajas que es inocuo, tiene efecto antimicrobiano y un efecto antirresortivo comprobado. Existe presentación comercial para uso directo en odontología (ampollas inyectables), también su capacidad inhibitoria de metaloproteinasas e inductora de la actividad celular y es de bajo costo. (12,13,55,57,61)

Por ello se plantea realizar un estudio experimental en un modelo experimental ya publicado, para estudiar actividad resortiva o antiresortiva. Consiste en fusionar células U937 químicamente con polietilenglicol (PEG). La fusión inicia la actividad resortiva cuando las células se adhieren a una matriz ósea (17). Utilizando este modelo evaluaremos comparativamente la actividad antirresortiva del propionato de clobetasol y el hidróxido de calcio (usados tradicionalmente en tratamiento de conductos) con la N-acetilcisteína (NAC).

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Se observa diferencia en la efectividad antiresortiva de la N- acetilcisteína (NAC) en comparación al propionato de clobetasol y el hidróxido de calcio en un modelo *in vitro* de células osteoclásticas?

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad se realiza un manejo autónomo de los procesos resorptivos en la práctica clínica en endodoncia, por esto queremos comparar la efectividad de 3 de las terapéuticas disponibles en la actualidad como lo son el hidróxido de calcio, propionato de clobetasol 0.05 % y la N-acetil cisteína (NAC) en un modelo *in vitro* de células U937 como una base para posteriormente realizar una investigación *in vivo*.

Los tratamientos encaminados a detener o tratar los procesos de resorción dental presentan una gran variabilidad, no existe un protocolo claro para su manejo, muchas veces se establecen como simples intentos basados en una decisión propia del clínico, justificado en sus propias experiencias que un tratamiento regido por protocolos científicos.

Sin embargo, la fundamentación científica basada en la literatura se sustenta en el manejo generalizado de resorciones no solo dentales, que proveen una serie de manejos terapéuticos encaminados a su detención.

Para un manejo específico y certero de los procesos de resorción radicular el clínico debe conocer las diferentes opciones de tratamiento, su repercusión y probabilidades de éxito para establecer o escoger la información suficiente para optimizar los recursos. Este estudio permitirá a través de un ensayo experimental en células U937 fusionadas por PEG determinar qué fármaco favorece y a qué nivel la detención de procesos resorptivos.

ESTADO DEL ARTE

La Asociación Americana de Endodoncia (AAE) define la Endodoncia como la rama de la odontología que estudia la morfología, fisiología y patología de la pulpa dental y tejidos perirradiculares, estableciendo los respectivos tratamientos que comprenden procedimientos clínicos con el objetivo de evitar y tratar la inflamación e infección de la pulpa dental y los tejidos perirradiculares; por medio de un adecuado diagnóstico, desinfección, conformación y obturación del sistema de conductos radiculares. (75)

La resorción radicular es la pérdida progresiva de dentina y cemento por la acción de los osteoclastos. Es un proceso fisiológico en la exfoliación de la dentición primaria, causado por la diferenciación de los osteoclastos debido a la presión ejercida por el diente permanente en erupción. Sin embargo, en la dentición secundaria el proceso es patológico. (76)

Los osteoclastos son las células responsables de la resorción de la superficie radicular. Los osteoclastos pueden, bajo determinadas condiciones, resorber los tejidos biomineralizados como el hueso, cartílago, cemento y dentina. Para que el osteoclasto inicie su función resorptiva, debe ser activado por el RANKL (ligando para el receptor activador del factor nuclear $\kappa \beta$), molécula principal involucrada en la activación del osteoclasto producida por los osteoblastos, las células del estroma, los linfocitos T, y fibroblastos entre otras. El RANKL se une al RANK (el receptor activador del factor nuclear κB), una proteína transmembrana expresada por los monocitos y los preosteoclastos. La unión del RANK con su ligando RANKL, induce la activación de una cascada de señalización intracelulares que llevan a la fusión de los precursores de sangre periférica y la diferenciación y activación de los osteoclastos. (14,15)

El daño al ligamento periodontal puede conducir a la activación de osteoclastos. Los osteoclastos que se encuentran cerca de la superficie de la raíz resorberán el cemento y la dentina subyacente. Esto puede variar en severidad desde la evidencia de lagunas microscópicas en la superficie radicular hasta destruir completamente la raíz. (34,35)

Cuando hay lesiones que provocan inflamación perirradicular (traumatismo, bacterias, blanqueamiento dental, movimiento ortodóntico, tratamiento periodontal), se sintetizan citoquinas proinflamatorias, se activa el sistema RANKL y los osteoclastos son activados resorbiendo la superficie de la raíz. (34,36,37)

A pesar de la prevalencia relativamente alta de esta complicación, las opciones de tratamiento son limitadas y no son efectivos en todos los casos; por lo que se deben buscar alternativas terapéuticas para tratar los procesos resortivos radiculares. (37)

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el potencial anti resortivo de la N-acetilcisteína, el propionato de clobetasol y el hidróxido de calcio en un modelo *in vitro* de células U937 fusionadas con PEG.

Objetivos específicos

- Evaluar marcadores celulares característicos de osteoclastos en las U937 fusionadas, tratadas con N- acetilcisteína (NAC), propionato de clobetasol o hidróxido de calcio.
- Evaluar la actividad de TRAP, en las células U937 fusionadas, tratadas con N- acetilcisteína (NAC) propionato de clobetasol o hidróxido de calcio.
- Evaluar la actividad resortiva, en las células U937 fusionadas tratadas con N- acetilcisteína (NAC) propionato de clobetasol o hidróxido de calcio.

METODOLOGÍA DE DESARROLLO DEL ESTUDIO

- **Láminas de hueso**

Las láminas de hueso se elaboraron a partir de hueso cortical bovino; inicialmente, los huesos se cortaron transversalmente con una sierra eléctrica y se lijaron manualmente hasta obtener láminas de hueso con superficies homogéneas con un área de 1cm² y un grosor de 0.5 mm. Antes de utilizar las láminas de hueso para realizar los cultivos celulares y el tratamiento con PEG, se sumergieron en una solución de SDS al 10% por 8 horas bajo agitación continua, se lavaron doce veces con agua destilada hasta eliminar totalmente el detergente, se esterilizaron con metanol puro por 60 minutos, se lavaron dos veces con medio RPMI suplementado con 10% SFB, finalmente se dejaron bajo luz U.V por 1 hora.

- **Fusión con PEG**

Para la fusión celular, las células U937 se lavaron tres veces con PBS-EDTA 0.02% sal disódica, fueron centrifugadas (700 x g) y resuspendidas en RPMI para contarlas (aproximadamente 1x10⁶). Se centrifugaron y se eliminó el sobrenadante, luego se colocó el tubo sobre gasa estéril para eliminar todo residuo de RPMI y evitar diluir el polietilenglicol (PEG). Se agregó 50 µl de PEG de peso molecular 1450 al 50% (p/v), previamente calentado a 37° C, se agitó suavemente, mediante golpes con el dedo en la base del tubo, para homogenizar el botón celular en el PEG y se llevó a 37° C durante 5 minutos. A partir de ese momento se adicionaron 40 µl de RPMI cada 60 segundos por 5 minutos, posteriormente 80 µl de RPMI cada minuto durante 5 minutos y 160 µl de RPMI cada minuto durante 5 minutos. Posteriormente las células se centrifugaron y se lavaron dos veces con RPMI para retirar el PEG.

- **Siembra y tratamiento con NAC, clobetasol e hidróxido de calcio.**

Las células U937 tratadas o no con PEG se resuspendieron en 30 µL de medio RPMI (por cada lámina ósea) enriquecido con SFB al 10%. Se sembraron en láminas de hueso puestas en cajas de 24 pozos por 2 horas para que se adhirieran a la lámina de hueso en una cámara al 5% CO₂, 95% de humedad a 37°C, después de este tiempo, los pozos fueron llevados a un volumen final de 400µl a una concentración de 30mM de NAC (Fluimucil 300 Mg en Ampollas), y dilución de 1:100 de la presentación comercial de hidróxido de calcio (UltraCal™ XS) y propionato de clobetasol (Clobetasol Propionato American

Generics 0.05 %); como grupo control se tuvieron los pozos de células fusionadas con PEG sin tratamiento adicional, o las células sin fusionar libres de tratamientos.

- **Prueba de fusión**

Se recolectó el medio en un tubo de Eppendorf, se lavó y se centrifugó. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el posible botón celular en 1 mL de PBS estéril. Se tomó una alícuota de 10 mL y la mezclamos con igual volumen de azul de tripán y la llevamos a una cámara de Neubauer y se tomó una foto de cada cuadrante y se contó el número de células.

- **Evaluación niveles ROS**

Para determinar el nivel de ROS las láminas en donde previamente se sembraron las células U937 fueron tratadas con 50 μ L de DHE [10 μ M] y DAPI [10 μ g/mL] en medio de cultivo por 30 minutos, después de este tiempo se fijaron con paraformaldehído al 4% por 10 minutos, luego las láminas fueron lavadas 4 veces con PBS. La lámina ósea se puso sobre una laminilla porta objetos, y se observó la inmunofluorescencia en un microscopio invertido de fluorescencia (SOPTOP ®, Kuala Lumpur, Malaysia) con un objetivo 40x a los 2 y 4 días de cultivo. Se tomaron 5 fotos representativas por cada lámina de hueso con el Software EZ-C1. Ver. Gold. 3.90 de la cámara digital Nikon C1 de 4 canales y los niveles ROS fueron determinados en cada fotografía cuantificando la intensidad de fluorescencia con el programa ImageJ 1.52a, Wayne Rasband National Institutes of Health, disponible en <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, los niveles se expresaron en Intensidad Media de Fluorescencia. Los ensayos fueron hechos por duplicado y se repitieron dos veces.

- **Anillos de actina**

Las células multinucleadas fusionadas se permeabilizaron con una mezcla de etanol/ácido acético (50:50 v/v), pre-enfriada a 0° C, durante 40 minutos a 4 °C, se lavaron 3 veces con PBS, se puso anticuerpo primario para actina diluido 1:1000 durante toda la noche, posteriormente se lavó nuevamente 3 veces con PBS con anticuerpo secundario 1:1000 y Falloidina a 0.33 μ M, luego se adicionó DAPI (0,1 microgramos por mililitro durante 5 minutos). Se observó la inmunofluorescencia de cada lámina de hueso en un microscopio invertido de fluorescencia (SOPTOP ®, Kuala Lumpur, Malaysia) con un objetivo 40x a los 2 y 4 días de cultivo. Se tomaron 5 fotos representativas por cada lámina de hueso con el Software EZ-C1. Ver. Gold. 3.90 de la cámara digital Nikon C1 de 4

canales y la presencia de anillos de actina se determinó cualitativamente. Los ensayos se realizaron por duplicado y se repitieron dos veces.

- **Evaluación de la expresión de fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP).**

Para evaluar si las células multinucleadas expresan fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) característica de los osteoclastos, las células se incubaron en pararosanilina hexazotizada con tartrato (2,8 g/mL) con nitrito de sodio en buffer veronal utilizando naftol fosfato AS-BI (Sigma) como sustrato y se adicionó tartrato de sodio (28 mg/10 ml), se ajustó el pH a 5.2. Posteriormente se dejaron a 37 °C durante 2 h, se lavaron en PBS, y el número de células fusionadas TRAP positivas se identificaron por el color rojizo, y se contaron en el microscopio de luz con un objetivo de 20X. Se realizó registro fotográfico siguiendo un camino en “W” sobre la superficie del hueso, se tomaron 5 fotos representativas con el Software EZ-C1. Ver. Gold. 3.90 de la cámara digital Nikon C1 de 4 canales. Para su evaluación, se cuantificaron las células totales TRAP+ (rojas ladrillo) con el programa ImageJ 1.52a, Wayne Rasband National Institutes of Health, disponible en <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, los resultados se expresaron en porcentaje de área TRAP positivas sobre área total. Los ensayos fueron hechos por duplicado y se repitieron dos veces.

- **Evaluación de la actividad resorptiva.**

Las células una vez tratadas como se describió anteriormente, se sembraron sobre láminas de hueso cortical bovino estériles de 0.5 mm de espesor. Como control experimental se evaluó la actividad resorptiva de células U937 en medio de cultivo sembradas en láminas de hueso. Para retirar las células de la lámina de hueso, se adicionó buffer de lisis RIPA durante 120 minutos. Para eliminar los residuos celulares o células no lisadas del hueso se frotaron cuidadosamente con un cepillo dental de cerdas suaves. El hueso se tiñó con azul de Commassie durante 30 minutos (en caso de haber sobre coloración del hueso, éste se puede decolorar con una mezcla de metanol – ácido acético – agua, 50:10:30, hasta encontrar el contraste necesario visualizado en microscopio óptico). Los cortes de hueso se observaron al microscopio óptico (20x) y se tomaron las 5 fotografías con el Software EZ-C1. Ver. Gold. 3.90 de la cámara digital Nikon C1 de 4 canales. El extendido de la resorción de cada fotografía se evaluó mediante el programa

Image] 1, y se expresó en porcentaje total de área resorbida. Los ensayos fueron hechos por duplicado y se repitieron dos veces.

Porcentaje de resorción = Área total resorbida/Área total del hueso X 100.

HIPÓTESIS

✓ La N- Acetilcisteína (NAC) es más efectiva en disminuir los procesos de resorción ósea en comparación al propionato de clobetasol o el hidróxido de calcio.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó ANOVA de una vía para determinar si existen diferencias significativas entre los grupos, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Los valores de $p < 0.05$ (intervalo de confianza del 95%) fueron considerados significativos. Se utilizó el error estándar.

RESULTADOS

ROS

En la evaluación de la expresión de ROS generado por las células U937 fusionadas con PEG al día 2 y 4 de cultivo se evidenció que, al adicionar curcumina, NAC (30Mm), hidróxido o clobetasol, existe una disminución significativa de la intensidad de fluorescencia comparado con el grupo de células fusionadas con PEG, pero sin ningún tratamiento adicionado (grupo control positivo), tanto al día 2 como al 4 de cultivo.

La expresión de ROS, evaluada como Intensidad Media de Fluorescencia, presenta diferencias en los diferentes tratamientos entre las células del día 2 y 4, sin embargo, no se observan diferencias significativas entre los medicamentos y tiene menor intensidad de fluorescencia el tratamiento con hidróxido de calcio, tanto al día 2 como al día 4.

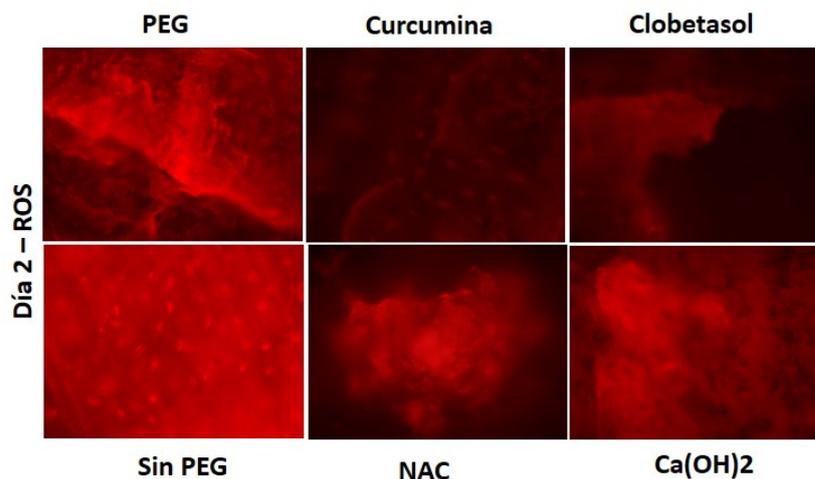


Figura 2 Evaluación de ROS sobre láminas óseas con los diferentes tratamientos, día 2. Fotos tomadas por Palma et al. 2021

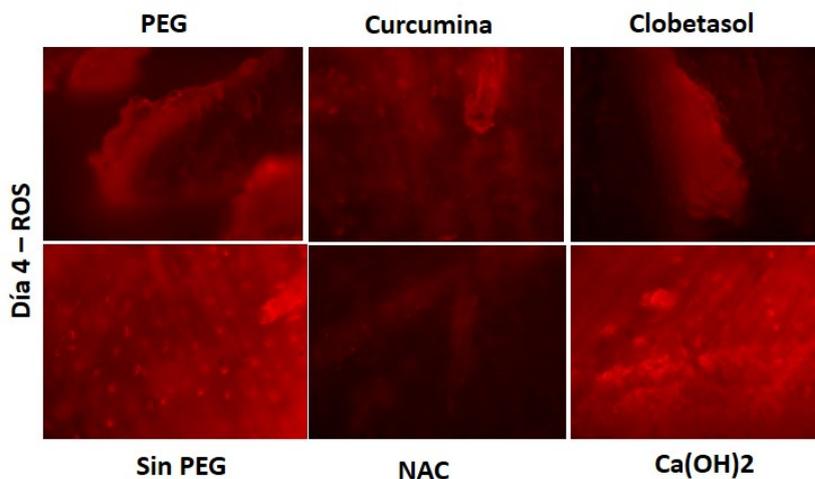


Figura 3 Evaluación de ROS sobre láminas óseas con los diferentes tratamientos, día 4. Fotos tomadas por Palma et al. 2021

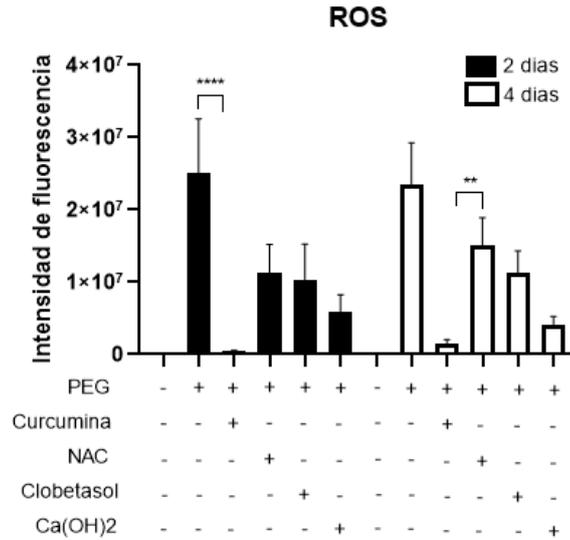


Figura 4 Gráfica comparativa de niveles de ROS con los diferentes tratamientos.

TRAP

Al evaluar la expresión de células U937 fusionadas con PEG TRAP + al día 2 y 4 de cultivo, se evidenció en el día 2 una mayor expresión de células multinucleadas TRAP+ al usar hidróxido de calcio y clobetasol en comparación con los grupos tratados con curcumina y NAC. Al día 4 se puede observar una disminución menor al 50% de las células multinucleadas TRAP + con todos los tratamientos. Sin embargo, sigue siendo mayor la disminución de las células TRAP + tratadas con curcumina.

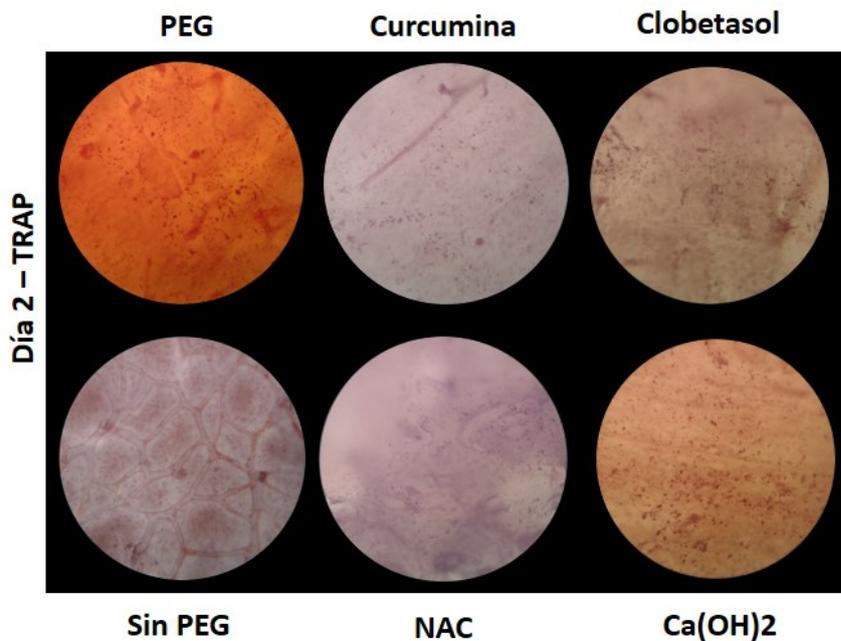


Figura 5 Evaluación de TRAP sobre láminas óseas con los diferentes tratamientos, día 2. Fotos tomadas por Palma et al. 2021

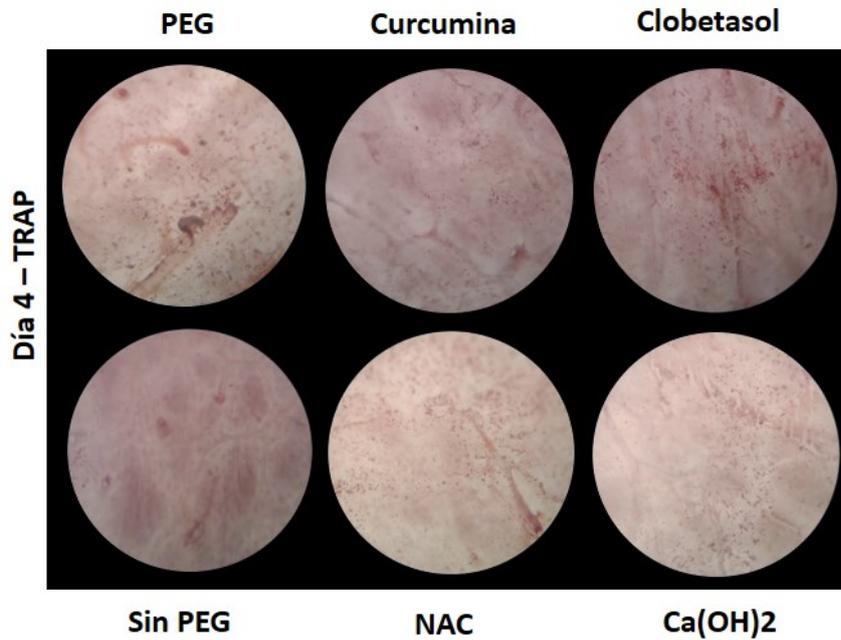


Figura 6 Evaluación de TRAP sobre láminas óseas con los diferentes tratamientos, día 4. Fotos tomadas por Palma et al. 2021

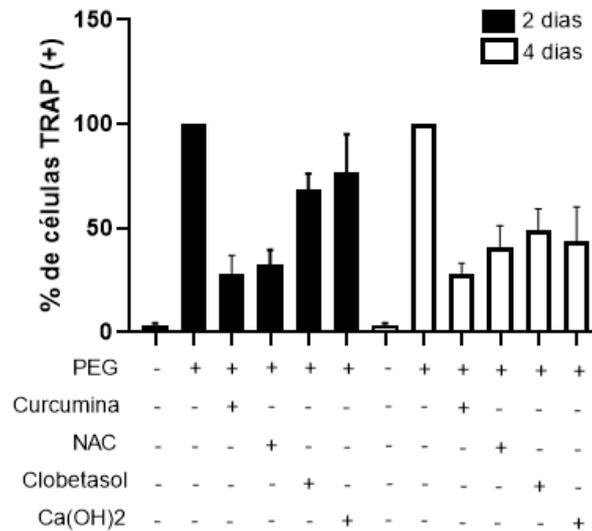


Figura 7 Gráfica comparativa del porcentaje de células TRAP + con los diferentes tratamientos.

RESORCIÓN

Al evaluar el porcentaje de resorción ósea, al día 2 se puede observar que la curcumina presenta una mayor actividad antirresortiva, seguido del hidróxido de calcio y NAC. Sin embargo, al día 4 se observa que NAC presenta una mejor actividad antirresortiva que el hidróxido de calcio, aunque no de manera significativa.

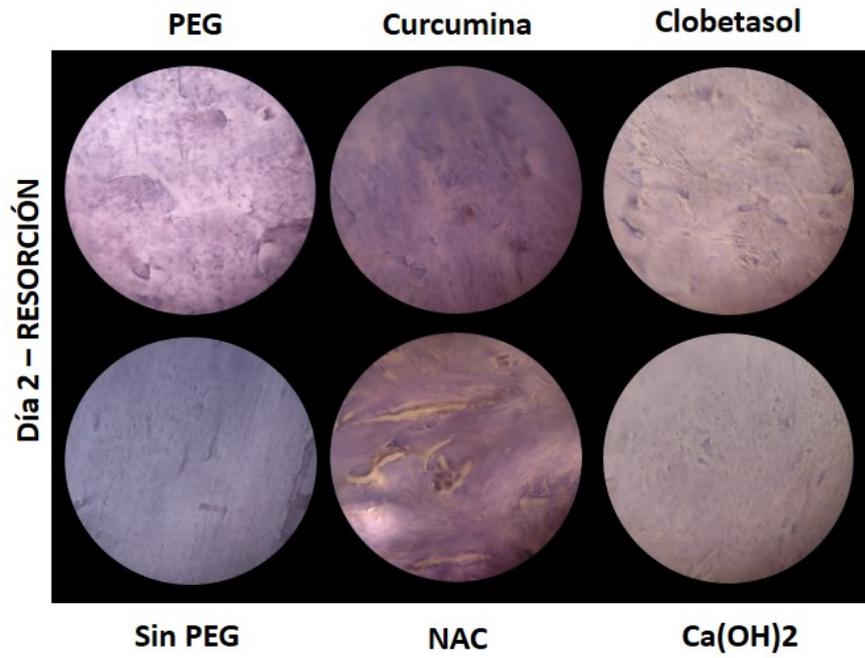


Figura 8 Evaluación de resorción sobre láminas óseas con los diferentes tratamientos, día 2. Fotos tomadas por Palma et al. 2021

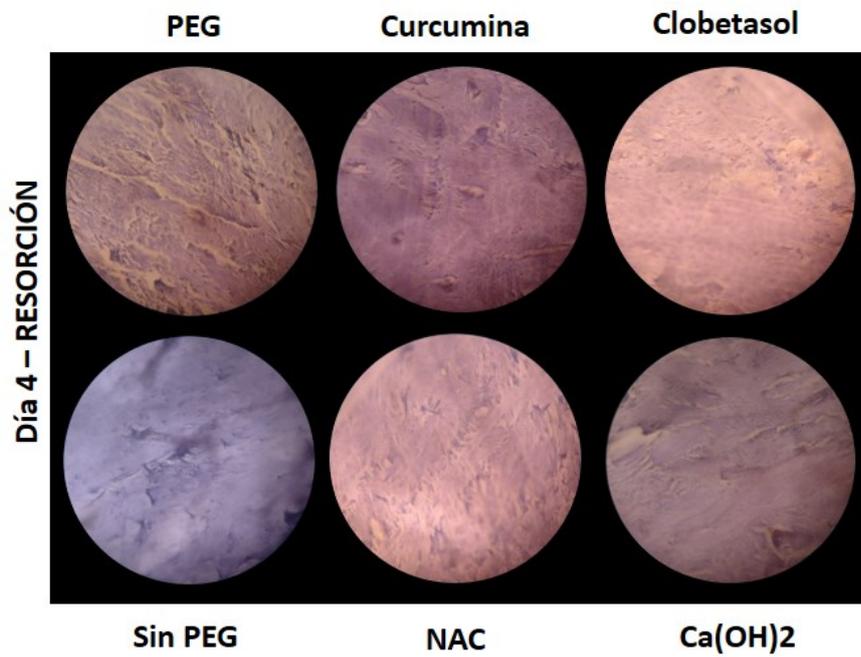


Figura 9 Evaluación de resorción sobre láminas óseas con los diferentes tratamientos, día 4. Fotos tomadas por Palma et al. 2021

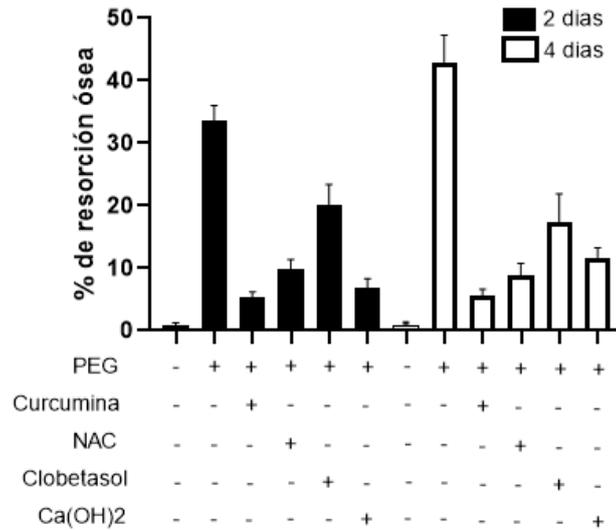


Figura 10 Gráfica comparativa del porcentaje de resorción ósea con los diferentes tratamientos.

ANILLOS DE ACTINA

En las células fusionadas con PEG se observa un aumento en la formación de anillos de actina. Cuando se agrega curcumina, se observa una disminución del número de células con expresión de anillos de actina asociada a la actividad antirresortiva de la curcumina. En los grupos tratados con clobetasol hay menos desorganización de los anillos de actina, seguido de los grupos tratados con NAC e hidróxido de calcio.

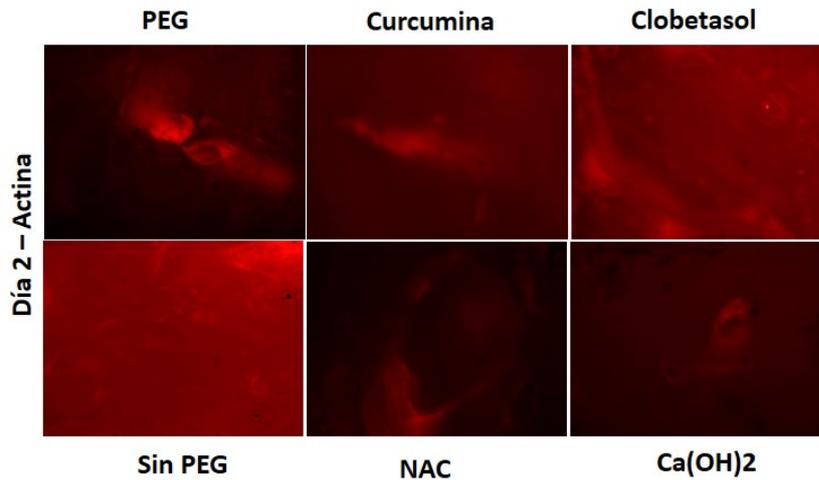


Figure 11 Evaluación de anillos de actina sobre láminas óseas con los diferentes tratamientos, día 2. Fotos tomadas por Palma et al. 2021

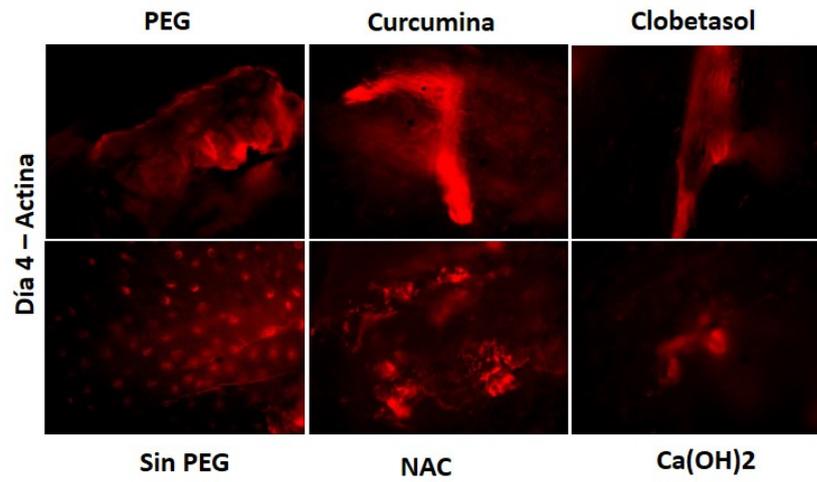


Figure 12 Evaluación de anillos de actina sobre láminas óseas con los diferentes tratamientos, día 4. Fotos tomadas por Palma et al. 2021

DISCUSIÓN

La resorción radicular externa es la complicación de mayor preocupación entre los endodoncistas. El manejo que se tome una vez diagnosticada es de vital importancia, para poder detenerla. En los diferentes intentos de controlarla se ha sugerido el uso de diferentes agentes terapéuticos como el hidróxido de calcio, el propionato de clobetasol (los más usados), la pasta Ledermix® y el Emdogain®; este último sin presentar grandes ventajas frente a los otros materiales. (2)

Una posible alternativa es el uso de la N-acetilcisteína (NAC), el cual es un potente agente antioxidante de origen vegetal, encontrado sobre todo en plantas de la especie *Allium*, especialmente en la cebolla, tiene efecto antiinflamatorio, antioxidante y antimicrobiano, ya que se ha demostrado que reduce eficazmente la formación de biopelículas en una variedad de bacterias grampositivas y gramnegativas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* entre otras. (12,13,55)

Su efecto antioxidante se da por un proceso metabólico que convierte el NAC en cisteína, la cual estimula la síntesis del glutatión, que es el antioxidante endógeno más abundante en los organismos vivos. Además, impide la oxidación de importantes moléculas estructurales y funcionales y el comienzo de lesiones por radicales libres por ser un eficaz agente reductor por la presencia de su grupo sulfhidrilo libre (-SH). Lo que se busca con el uso de NAC es restaurar las defensas antioxidantes, lo que bloquea la actividad de Nox (NADPH oxidasa) necesaria para el proceso de formación de ROS. (12)

Su actividad antiinflamatoria se asocia con la disminución de la vía de señalización asociada al NF- κ B; NAC suprime la ubiquitinación y degradación de I- κ B (un inhibidor de NF- κ B) y, por lo tanto, bloquea la translocación y activación nuclear de NF- κ B. También previene la expresión de citocinas proinflamatorias inducidas por lipopolisacáridos, como la interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6 e IL-8, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y el factor de crecimiento transformante (TGF- β) en macrófagos y fibroblastos. (61)

En la literatura se ha demostrado la eficacia antirresortiva de la NAC a nivel sistémico para el manejo de enfermedades como la osteoporosis (77,78), pero a nivel endodóntico los estudios se han encaminado a estudiar la actividad antimicrobiana por eliminación de la biopelícula endodóntica, demostrando una mayor eficacia sobre medicamentos

intraconducto tradicionales como el hidróxido de calcio y la clorhexidina (12,13); también se ha demostrado su eficacia sobre el aumento de moléculas como las resolvinas E1 y D2 en tejidos periapicales (61), las cuales favorecen la resolución de los procesos inflamatorios.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el potencial del efecto antirresortivo de la NAC frente al propionato de clobetasol y el hidróxido de calcio, para su posible utilización como medicamento intraconducto. Para esto, se comparó el efecto de los tres medicamentos en un modelo *in vitro* de resorción utilizando la línea celular U937 fusionadas con PEG sobre láminas de hueso bovino. (19)

En este estudio evidenciamos que la NAC es el medicamento con mejor comportamiento presentando una importante capacidad antirresortiva que se puede mantener en el tiempo (día 2: 9,9%, día 4: 8,9%), en contraste con el grupo tratado con hidróxido de calcio, donde con el tiempo, aumenta el porcentaje de área de resorción (día 2: 6,8%, día 4: 11,7%). De igual modo, encontramos que las láminas óseas tratadas con clobetasol muestran un aumento importante en el porcentaje de resorción en comparación con los otros medicamentos tanto al día 2 como al día 4 (20,2% y 17,3%, respectivamente), pero sin diferencias significativas. Cabe mencionar que en la literatura se recomienda el uso intracanal más prolongado de este medicamento (de 2 a 4 semanas) y es muy común utilizar el corticoide mezclado con un antibiótico (minociclina es el más usado). (1,38)

La NAC fue más efectiva que el hidróxido de calcio y el clobetasol para inhibir la actividad resortiva en este modelo de hueso bovino.

Por otro lado, la curcumina es un compuesto extraído de los rizomas de la cúrcuma que es un eficaz agente antiinflamatorio y antioxidante. Tenemos resultados positivos e interesantes para sugerir a la curcumina como un compuesto modulador de las resorciones radiculares, al mostrar los mejores resultados en cuanto al porcentaje de área de resorción, menor intensidad de fluorescencia y menor porcentaje de células TRAP + que los medicamentos estudiados.

Se ha encontrado en la literatura que la curcumina inhibe la pérdida ósea al reducir la osteoclastogénesis mediante el aumento de la actividad antioxidante y el deterioro de la señalización de RANKL. Este efecto protector de la curcumina sobre la osteoclastogénesis parece ocurrir a través de la mejora de la activación de las vías Akt/NF-kB/NFATc1 (factor

nuclear de células T activadas 1). Además de mostrar un efecto inmunomodulador sobre la polarización de los macrófagos mediante la regulación negativa de las citocinas proinflamatorias y la regulación positiva de las citocinas antiinflamatorias. Adicionalmente, este fitoquímico tiene capacidad antioxidante, por lo que regula el metabolismo óseo al reducir la producción de ROS y mejorar las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. (79–81)

CONCLUSIÓN

Al evaluar los perfiles de biocompatibilidad y eficacia del uso de la N-acetilcisteína, el propionato de clobetasol y el hidróxido de calcio en un modelo *in vitro* de células U937 fusionadas con PEG sobre láminas de hueso, observamos que los nuevos medicamentos propuestos tienen una importante capacidad antirresortiva al disminuir la osteoclastogénesis y la actividad de las células osteoclásticas maduras y este mecanismo se mantiene en el tiempo; por lo que pueden ser beneficiosos en diferentes procesos patológicos perirradiculares. Al utilizar como control a la curcumina, un compuesto extraído de los rizomas de la cúrcuma que es un eficaz agente antiinflamatorio y antioxidante, se obtienen resultados interesantes para tener en cuenta como compuesto modulador de las resorciones radiculares. Es importante anotar, que los materiales se utilizaron *in vitro* directamente sobre la matriz ósea, por lo que se sugiere evaluar la capacidad de difusión de los materiales a través de la dentina, y el papel amortiguador de la dentina para determinar su potencia antirresortiva al ser utilizados como medicamentos intraconductos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jordán Mariño F, Sossa Rojas H, Estrada Montoya JH. Protocolo de manejo de diente permanente avulsionado para el servicio de salud oral de la Fundación Hospital La Misericordia y la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá (2011). *Univ Odontol* [Internet]. 2012;31(66):185–210. Available from: <http://www.javeriana.edu.co/>
2. Mohammadi Z, Cehreli ZC, Shalavi S, Giardino L, Palazzi F, Asgary S. Management of root resorption using chemical agents: A review. *Iran Endod J*. 2016 Dec 1;11(1):1–7.
3. Wong KS, Sae-Lim V. The effect of intracanal Ledermix on root resorption of delayed-replanted monkey teeth. *Dent Traumatol* . 2002;18(6):309–15.
4. Bryson E, Levin L, Banchs F, Abbott P, Trope M. Effect of immediate intracanal placement of Ledermix Paste 1 on healing of replanted dog teeth after extended dry times. *Dent Traumatol*. 2002;18(6):316–21.
5. Mohammadi Z, Dummer PMH. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J*. 2011 Aug;44(8):697–730.
6. Pierce A, Lindskog S. The effect of an antibiotic/corticosteroid paste on inflammatory root resorption in vivo. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 1987;64:216–20.
7. Ba-Hattab R, Al-Jamie M, Aldreib H, Alessa L, Alonazi M. Calcium Hydroxide in Endodontics: An Overview. *Open J Stomatol*. 2016;6(12):274–89.
8. Kirakozova A, Teixeira FB, Curran AE, Gu F, Tawil PZ, Trope M. Effect of Intracanal Corticosteroids on Healing of Replanted Dog Teeth after Extended Dry Times. *J Endod*. 2009 May;35(5):663–7.
9. Panzarini SR, Trevisan CL, Brandini DA, Poi WR, Sonoda CK, Luvizuto ER, et al. Intracanal dressing and root canal filling materials in tooth replantation: A literature review. *Dent Traumatol*. 2012 Feb;28(1):42–8.
10. Jares E, Pignataro O. Mecanismos moleculares de acción de los corticoides. *Arch Alerg e Inmunol Clínica*. 2002;33(1).

11. Winterbourn CC, Metodiewa D. Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med.* 1999;27(3-4):322-8.
12. Quah SY, Wu S, Lui JN, Sum CP, Tan KS. N-acetylcysteine inhibits growth and eradicates biofilm of enterococcus faecalis. *J Endod.* 2012 Jan;38(1):81-5.
13. Choi YS, Kim C, Moon JH, Lee JY. Removal and killing of multispecies endodontic biofilms by N-acetylcysteine. *Brazilian J Microbiol.* 2018 Jan 1;49(1):184-8.
14. Suda T, Takahashi N, Martin TJ. Modulation of Osteoclast Differentiation. *Endocr Rev.* 1992;13(1):66-80.
15. Roodman GD. Cell biology of the osteoclast. *Exp Hematol.* 1999;27:1229-41.
16. Ballesteros JV, Socha M, Serrano AK. Avances en Biología Osea: El Osteoclasto. *Rev la Fac Med.* 1999;47(4):217-20.
17. Hammarstrom L. General morphological aspects of resorption of teeth and alveolar bone. *Int Endod J.* 1985;18:93-108.
18. Duong LT, Lakkakorpi P, Nakamura I, Rodan GAR. Mini Review - Integrins and signaling in osteoclast function. *Matrix Biol.* 2000;19:97-105.
19. Murillo A, Guerrero CA, Acosta O, Cardozo CA. BR Bone resorptive activity of osteoclast-like cells generated in vitro by PEG-induced macrophage fusion. *Biol Res.* 2010;43:205-24.
20. Lensch MW, Mummery CL. From stealing fire to cellular reprogramming: A scientific history leading to the 2012 Nobel Prize. *Stem Cell Reports.* 2013;1(1):5-17.
21. Ieda M. Direct reprogramming into desired cell types by defined factors. *Keio J Med.* 2013 Sep;62(3):74-82.
22. Musunuru K. Genome editing of human pluripotent stem cells to generate human cellular disease models. *Dis Model Mech.* 2013 Jul;6(4):896-904.
23. Del Nero-Viera G. La resorción como proceso inflamatorio. Aproximación a la patogenia de las resorciones dentaria y periodontal. *Rev del Ilus Cons Gen Colegios*

- Odontólogos y Estomatólogos España. 2005;10(5-6):545-56.
24. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of Osteoclast Differentiation and Function by the New Members of the Tumor Necrosis Factor Receptor and Ligand Families. *Endocr Rev.* 1999;20(3):345-57.
 25. Qin A, Cheng TS, Pavlos NJ, Lin Z, Dai KR, Zheng MH. V-ATPases in osteoclasts: Structure, function and potential inhibitors of bone resorption. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012 Sep;44(9):1422-35.
 26. Anderson RE, Woodbury DM, Jee WSS. Calcified Tissue International Humoral and Ionic Regulation of Osteoclast Acidity. Vol. 39, *Calcified Tissue International.* 1986.
 27. Yamada Y, Ito A, Sakane M, Miyakawa S, Uemura T. Laser microscopic measurement of osteoclastic resorption pits on biomaterials. *Mater Sci Eng C.* 2007 May 16;27(4):762-6.
 28. Edwards JR, Sun SG, Locklin R, Shipman CM, Adamopoulos IE, Athanasou NA, et al. LIGHT (TNFSF14), a novel mediator of bone resorption, is elevated in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006 May;54(5):1451-62.
 29. Fouque-Aubert A, Chapurlat R. Influence of RANKL inhibition on immune system in the treatment of bone diseases. Vol. 75, *Joint Bone Spine.* 2008. p. 5-10.
 30. Akiyama T, Shinzawa M, Akiyama N. RANKL-RANK interaction in immune regulatory systems. *World J Orthop.* 2012;3(9):142-50.
 31. Aitken CJ, Hodge JM, Nishinaka Y, Vaughan T, Yodoi J, Day CJ, et al. Regulation of human osteoclast differentiation by thioredoxin binding protein-2 and redox-sensitive signaling. *J Bone Miner Res.* 2004 Dec;19(12):2057-64.
 32. Rifas L, Weitzmann MN. A novel T cell cytokine, secreted osteoclastogenic factor of activated T cells, induces osteoclast formation in a RANKL-independent manner. *Arthritis Rheum.* 2009 Nov;60(11):3324-35.
 33. Lecaille F, Brömme D, Lalmanach G. Biochemical properties and regulation of cathepsin K activity. *Biochimie.* 2008 Feb;90(2):208-26.
 34. Ne RF, Witherspoon DE, Gutmafin JL. Tooth resorption. *Quintessence Int (Berl).* 1999;30:9-25.

35. Gunraj, Maurice N. Dental root resorption. *Oral surgery, Oral Med Oral Pathol.* 1999;88(6):647–53.
36. Fuss Z, Tsesis I, Lin S. Root resorption - diagnosis, classification and treatment choices based on stimulation factors. *Dent Traumatol.* 2003;19:175–82.
37. Darcey J, Qualtrough A. Root Resorption: Simplifying diagnosis and improving outcomes. *Prim Dent J.* 2016;5(2):36–45.
38. Abbott P V. Prevention and management of external inflammatory resorption following trauma to teeth. *Aust Dent J.* 2016 Mar 1;61:82–94.
39. Ahangari Z, Nasser M, Mahdian M, Fedorowicz Z, Marchesan MA. Interventions for the management of external root resorption. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015 Nov 24;2015(11).
40. Lu J, Liu H, Lu Z, Kahler B, Lin LM. Regenerative Endodontic Procedures for Traumatized Immature Permanent Teeth with Severe External Root Resorption and Root Perforation. *J Endod.* 2020 Nov 1;46(11):1610–5.
41. Hecova H, Tzigkounakis V, Merglova V, Netolicky J. A retrospective study of 889 injured permanent teeth. *Dent Traumatol.* 2010 Dec;26(6):466–75.
42. Bergmans L, Van Cleynenbreugel J, Verbeken E, Wevers M, Van Meerbeek B, Lambrechts P, et al. Cervical external root resorption in vital teeth X-ray microfocus-tomographical and. *J Clin Periodontol.* 2002;29:2002.
43. Da Silveira HLD, Silveira HED, Liedke GS, Lermen CA, Dos Santos RB, De Figueiredo JAP. Diagnostic ability of computed tomography to evaluate external root resorption in vitro. *Dentomaxillofacial Radiol.* 2007 Oct;36(7):393–6.
44. Trope M. Luxation Injuries and External Root Resorption-Etiology, Treatment, and Prognosis. 2000;28(11):860–6.
45. Gulsahi A, Gulsahi K, Ungor M. Invasive cervical resorption: clinical and radiological diagnosis and treatment of 3 cases. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 2007 Mar;103(3):e65–72.
46. Sundstrom C, Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer.* 1976;17:565–77.

47. Wei F, Wang C, Zhou G, Liu D, Zhang X, Zhao Y, et al. The effect of centrifugal force on the mRNA and protein levels of ATF4 in cultured human periodontal ligament fibroblasts. *Arch Oral Biol.* 2008 Jan;53(1):35–43.
48. Lorenzo JA, Sousa SL, Alander C, Raisz LG, Dinarello CA. Comparison of the Bone-Resorbing Activity in the Supernatants from Phytohemagglutinin-Stimulated Human Peripheral Blood Mononuclear Cells with That of Cytokines Through the Use of an Antiserum to Interleukin 1*. *Endocrinology.* 1987;121(3):1164–70.
49. Kotake S, Udagawa N, Hakoda M, Mogi M, Yano K, Tsuda E, et al. Activated Human T Cells Directly Induce Osteoclastogenesis From Human Monocytes Possible Role of T Cells in Bone Destruction in Rheumatoid Arthritis Patients. *Arthritis Rheum.* 2001;44(5):1003–12.
50. Messer HH, Chen R-S. The Duration of Effectiveness of Root Canal Medicaments Duracion de la Eficacia de Medicamentos para Conductos. *J Endodontics.* 1984;10(6):240–5.
51. Haapasalo HK, Sire EK, Waltimo TMT, Érstavik D, Haapasalo MPP. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. *Int Endod J.* 2000;33:126–31.
52. Portenier I, Haapasalo H, Rye A, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo & M. Inactivation of root canal medicaments by dentine, hydroxylapatite and bovine serum albumin. *Int Endod J.* 2001;34:184–8.
53. Kapugi M, Cunningham K. Corticosteroids. *Orthop Nurs.* 2019 Sep 1;38(5):336–9.
54. Gestrelius S, Andersson C, Johansson A-C, Persson E, Brodin A, Rydhag L, et al. Formulation of enamel matrix derivative for surface coating Kinetics and cell colonization. *J Clin Periodontol.* 1997;24:678–84.
55. Šalamon Š, Kramar B, Marolt TP, Poljšak B, Milisav I. Medical and dietary uses of n-acetylcysteine. *Antioxidants.* 2019 May 1;8(5):1–16.
56. Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Review Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60:6–20.
57. Suntres ZE. Role of antioxidants in paraquat toxicity. *Toxicology.* 2002 Oct

- 30;180(1):65–77.
58. Lee NK, Choi YG, Baik JY, Han SY, Jeong DW, Bae YS, et al. A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. *Blood*. 2005 Aug 1;106(3):852–9.
 59. Halleen JM, Räsänen S, Salo JJ, Reddy S V, David Roodman G, Hentunen TA, et al. Intracellular Fragmentation of Bone Resorption Products by Reactive Oxygen Species Generated by Osteoclastic Tartrate-resistant Acid Phosphatase*. *J Biol Chem*. 1999;274(33):22907–22910.
 60. Nishimi M, Nakamura K, Hisada A, Endo K, Ushimura S, Yoshimura Y, et al. Effects of N-acetylcysteine on root resorption after tooth replantation. *Pediatr Dent J*. 2020 Aug 1;30(2):72–9.
 61. Corazza BJM, Martinho FC, Khoury RD, Toia CC, Orozco EIF, Prado RF, et al. Clinical influence of calcium hydroxide and N-acetylcysteine on the levels of resolvins E1 and D2 in apical periodontitis. *Int Endod J*. 2021 Jan 1;54(1):61–73.
 62. Kong Y-Y, Yoshida H, Sarosi I, Tan H-L, Timms E, Capparelli C, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*. 1999;397(315–323).
 63. Abu-Amer Y. Advances in Osteoclast Differentiation and Function. *Endocr Metab Disord*. 2005;5:347–55.
 64. Blair HC, Schlesinger PH, Ross P, Teitelbaum S. Recent advances toward understanding osteoclast physiology. *Clin Orthop Relat Res*. 1993;294:7–22.
 65. Loechel F, Fox JW, Murphy G, Albrechtsen R, Wewer UM. ADAM 12-S cleaves IGFBP-3 and IGFBP-5 and is inhibited by TIMP-3. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Nov 30;278(3):511–5.
 66. Miyamoto T. STATs and macrophage fusion. *JAK-STAT*. 2013 Jul 15;2(3):e24771–7.
 67. Yao GF, Feng HT, Cai YL, Qi WL, Kong KM. Characterization of vacuolar-ATPase and selective inhibition of vacuolar-H(+)-ATPase in osteoclasts. Vol. 357, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007. p. 821–7.
 68. Chellaiah MA. Regulation of podosomes by integrin $\alpha\beta 3$ and Rho GTPase-

- facilitated phosphoinositide signaling. *Eur J Cell Biol.* 2006 Apr 7;85(3-4):311-7.
69. Kukita T, Wada N, Kukita A, Kakimoto T, Sandra F, Toh K, et al. RANKL-induced DC-STAMP is essential for osteoclastogenesis. *J Exp Med.* 2004 Oct 4;200(7):941-6.
70. Yagi M, Miyamoto T, Sawatani Y, Iwamoto K, Hosogane N, Fujita N, et al. DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. *J Exp Med.* 2005 Aug 1;202(3):345-51.
71. Beaudreuil J, Balasubramanian S, Chenais J, Taboulet J, Frenkian M, Orcel P, et al. Molecular characterization of two novel isoforms of the human calcitonin receptor. *Gene.* 2004 Dec 8;343(1):143-51.
72. Quinn JMW, Morfis M, Lam MHC, Elliott J, Kartsogiannis V, Williams ED, et al. Calcitonin Receptor Antibodies in the Identification of Osteoclasts. *Bone.* 1999;25(1):1-8.
73. Hayman AR, Warburton MJ, Pringle JAS, Colest B, Chambers TJ. Purification and characterization of a tartrate-resistant acid phosphatase from human osteoclastomas. *Biochem J.* 1989;261:601-9.
74. Faust J, Lacey DL, Hunt P, Burgess TL, Scully S, Van G, et al. Osteoclast Markers Accumulate on Cells Developing From Human Peripheral Blood Mononuclear Precursors. *J Cell Biochem.* 1999;72:67-80.
75. Eleazer PD, Glickman GN, Scott JD, Mcclanahan B, Terry MS, Webb D, et al. Glossary of Endodontic Terms - AAE [Internet]. 2020. p. 1-48. Available from: www.aae.org
76. Patel S, Pitt Ford T. Is the resorption external or internal? *Dent Update.* 2007;34:218-29.
77. Zhou X, Wang Z, Ni Y, Yu Y, Wang G, Chen L. Suppression effect of N-acetylcysteine on bone loss in ovariectomized mice. *Am J Transl Res.* 2020;12(3):731-42.
78. Chen L, Wang G, Wang Q, Liu Q, Sun Q. N-acetylcysteine prevents orchietomy-induced osteoporosis by inhibiting oxidative stress and osteocyte senescence. *Am J Transl Res.* 2019;11(7):4337-47.
79. Martiniakova M, Babikova M, Omelka R. Pharmacological agents and natural compounds: Available treatments for osteoporosis. *J Physiol Pharmacol.*

2020;71(3):1-14.

80. Bharti AC, Takada Y, Aggarwal BB. Curcumin (Diferuloylmethane) Inhibits Receptor Activator of NF- κ B Ligand-Induced NF- κ B Activation in Osteoclast Precursors and Suppresses Osteoclastogenesis. *J Immunol.* 2004 May 15;172(10):5940-7.
81. Moon HJ, Ko WK, Han SW, Kim DS, Hwang YS, Park HK, et al. Antioxidants, like coenzyme Q10, selenite, and curcumin, inhibited osteoclast differentiation by suppressing reactive oxygen species generation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Feb 10;418(2):247-53.