

**EVALUACION DEL POTENCIAL ANTI RESORTIVO DE LA
N - ACETILCISTEINA (NAC), EL PROPIONATO DE CLOBETASOL Y EL HIDROXIDO DE CALCIO
EN UN MODELO IN VITRO DE CELULAS U937**

Adriana María Alvarado Gómez

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE
ESPECIALIZACION EN ENDODONCIA - FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
BOGOTA DC . AGOSTO 2020**

HOJA DE IDENTIFICACION

Universidad El Bosque

Facultad Odontología

Programa Especialización en Endodoncia

Título: Evaluacion del potencial anti resortivo de la N acetilcisteina (NAC), el propionato de clobetasol y el hidróxido de calcio en un modelo in vitro de células U937

Línea de investigación: Materiales

Institución participante: Facultad de Odontología - Universidad El Bosque
Facultad de Medicina - Universidad Nacional de Colombia
Laboratorio de biología molecular de virus

Tipo de investigación: Posgrado/línea docente

Estudiantes/ residentes: Adriana María Alvarado Gómez

Director: Dr. Henry Sossa Rojas

Codirector: Dra. Diana Carolina Alzate Mendoza
Dr.Luis Fernando Gamboa

DIRECTIVOS UNIVERSIDAD EL BOSQUE

TIANA CIAN LEAL	Presidente del Claustro
CAMILO ALBERTO ESCOBAR JIMÉNEZ	Presidente Consejo Directivo
MARIA CLARA RANGEL GALVIS	Rector(a)
RITA CECILIA PLATA DE SILVA	Vicerrector(a) Académico
FRANCISCO JOSÉ FALLA CARRASCO	Vicerrector Administrativo
MIGUEL OTERO CADENA	Vicerrectoría de Investigaciones.
CRISTINA MATIZ MEJÍA	Secretaria General
JUAN CARLOS SANCHEZ PARIS	División Postgrados
MARIA ROSA BUENAHORA TOVAR	Decana Facultad de Odontología
MARTHA LILILIANA GOMEZ RANGEL	Secretaria Académica
DIANA MARIA ESCOBAR JIMENEZ	Director Área Bioclínica
ALEJANDRO PERDOMO RUBIO	Director Área Comunitaria
FRANCISCO PEREIRA MANRIQUE	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.Pregunta de investigación	3
3.Planteamiento del problema	4
4.Objetivos	6
5.Hipótesis	7
6.Justificación	8
7.Estado del arte	9
8.Marco teórico	11
9. Metodología para el desarrollo de la revisión	25
9.1 Tipo de estudio	25
9.2 Métodos	25
9.3 Estructura de la revisión	25
9.4 Estructura de estrategia de búsqueda por temática	25
10.Metodologia de desarrollo del estudio	27
11.Referencias bibliográficas	31

RESUMEN

EVALUACION DEL POTENCIAL ANTI RESORTIVO DE LA N - ACETILCISTEINA (NAC), EL PROPIONATO DE CLOBETASOL Y EL HIDROXIDO DE CALCIO EN UN MODELO IN VITRO DE CELULAS U937

Actualmente, se lleva a cabo un manejo autónomo y empírico de los procesos de primavera en la práctica clínica en endodoncia, por esta razón queremos comparar la efectividad de 3 de las terapias disponibles actualmente, tales como hidróxido de calcio, propionato de clobetasol al 0.05% y n-acetil cisteína (NAC) en un modelo in vitro de células U937 como base para una mayor investigación in vivo.

Los tratamientos destinados a detener o tratar los procesos de reabsorción dental tienen una gran variabilidad, no existe un protocolo claro para su manejo, muchas veces se establecen como simples intentos basados en la decisión del médico, justificados en sus propias experiencias de que un tratamiento regido por protocolos científicos.

Sin embargo, la base científica basada en la literatura se basa en el manejo generalizado de las resorciones, no solo dentales, que proporcionan una serie de enfoques terapéuticos destinados a su detención.

Para un manejo específico y preciso de los procesos de reabsorción de raíces, el clínico debe conocer las diferentes opciones de tratamiento, su repercusión y la probabilidad de éxito para establecer o elegir 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 en qué nivel la detención de procesos recurrentes.

Palabras clave: N acetilcisteína - Anti resortivo – Clobetasol – Osteoclasto – Celulas U937 – Hidroxido de calcio.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE ANTI-RESORTIVE POTENTIAL OF THE N ACETILCISTEINA (NAC), CLOBETASOL PROPIONATE AND CALCIUM HYDROXIDE IN A VITRO MODEL OF CELLS U937

Currently, an autonomous and empirical management of spring processes is carried out in clinical practice in endodontics, for this reason we want to compare the transformation of 3 of the currently available therapies, stories such as calcium hydroxide, clobetasol propionate 0.05% and n-acetyl cysteine (NAC) in an in vitro model of U937 cells as the basis for further in vivo research.

Treatments aimed at stopping or treating dental resorption processes have great variability, there is no clear protocol for their management, many times they are considered as simple attempts treated in the doctor's decision, justified in their own experiences that a regulated treatment by scientific protocols.

However, the scientific basis based on the literature is based on the widespread management of resorptions, not only dental, which require a series of therapeutic approaches aimed at their arrest.

For a specific and precise management of the processes of root reabsorption, the clinician must know the different treatment options, their repercussion and the probability of success to establish or choose sufficient information to optimize resources. This study avoided, through an experimental test in U937 cells fused by PEG, determining which drug favors and at what level the arrest of recurrent processes.

Key words: N acetylcysteine - Anti rearrangement - Clobetasol - Osteoclasts - U937 cells - Calcium hydroxide.

1. Introducción

La resorción radicular externa es la complicación de mayor preocupación en el tratamiento de dientes traumatizados. Una vez ha sido diagnosticada, se deben poner en marcha medidas rápidas para detenerla o incluso para prevenirla y, de esta forma, mejorar el pronóstico del diente. La resorción radicular se observa como un proceso fisiológico normal en la dentición temporal por los procesos de erupción del germen permanente; pero en condiciones normales no se observa en dentición permanente y se puede asociar a condiciones patológicas. La célula que actúa en los procesos de resorción es el osteoclasto.

En presencia de inflamación perirradicular, la resorción se produce básicamente en el hueso y el aparato de inserción; pero la parte apical de la raíz sufre poco o ningún daño. Se han postulado dos teorías o hipótesis 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. En los diferentes intentos para controlar la resorción se ha sugerido el uso de agentes terapéuticos como son la pasta de ledermix que es la combinación de un antibiótico y un corticoesteroide y que es usada como medicamento intraconducto, otros materiales como el hidróxido de calcio pueden ser usados para la estimulación de la formación de tejido duro sobre la superficie radicular afectada.

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, demostró histológicamente que el ledermix erradica experimentalmente la resorción radicular inflamatoria inducida.

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

Cabe resaltar que los corticoides son potentes agentes antiinflamatorios que se administran para suprimir los efectos nocivos de la respuesta inmunitaria de origen alérgico o autoinmunitario, así como de las inducidas por rechazo de trasplantes. Los corticosteroides son derivados farmacológicos de miembros de la familia de los glucocorticoides de las hormonas esteroides (8,61,64). Los corticoides tienen un efecto sobre la resorción radicular por la inhibición de las vías de síntesis de 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. Múltiples estudios han informado el uso de la N-Acetilcisteína frente a diversas patologías; siendo este un medicamento de interés para el manejo y tratamiento de las patologías endodónticas como los procesos resortivos por su efecto antiinflamatorio y antimicrobiano.

2. Pregunta de investigación

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

3. Planteamiento del problema

En la actualidad clínica en endodoncia para el manejo de los procesos resorptivos podemos encontrar diferentes alternativas como lo son hidróxido de calcio, propionato de clobetasol 0,05 % , propionato de clobetasol 0.05% con minociclina y n acetil cisteina (NAC).(1,2,3,4)

Rutinariamente en endodoncia se usa el hidróxido del 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 de 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 iónica en iones calcio e iones hidroxilo explica su acción sobre los tejidos, posee valiosas cualidades desde el punto de vista biológico, antimicrobiano y mineralizador.(14,15,16), pero tiene desventajas como lo son 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 tubulo dentinal por el tamaño de la partícula y es muy soluble (15,16,17).

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 lentulos 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.(14,15,116), 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 antibiotico tipo tetraciclina genera pigmentación dentinal. (32,33)

Una posible alternativa es el uso de la n acetil cisteina (NAC) que tiene como ventajas: es inocuo, tiene efecto antimicrobiano, y un efecto antiresortivo comprobado (39.) 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.

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

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

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

4.2 Objetivos específicos

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

5. 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.

6. Justificación

En la actualidad se realiza un manejo autónomo y en ocasiones empírico 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 que fármaco favorece y a que nivel la detención de procesos resorptivos.

7. 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 periradicular, 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. (5,6).

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. (5,6).

Los osteoclastos son las células responsables de la resorción de la superficie de la raíz. Los osteoclastos pueden bajo determinadas condiciones resorber los tejidos biomineralizados como el hueso, cartílago, cemento y dentina. (5,6).

Para que el osteoclasto inicie su función resortiva, 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 $\kappa\beta$), 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. (5,6).

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. (5,6).

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. (7,8).

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 resorptivos radiculares.(8,9).

8. Marco teórico

8.1 Osteoclasto

Los osteoclastos como los conocemos actualmente fueron descritos en 1873 por Kolliker, quien propone inicialmente el término de ostoklast para células multinucleadas, móviles, que presentan en su superficie activa una estructura que se describe en la literatura como borde en cepillo y que aún es vigente para la superficie en contacto con el tejido óseo, dentina o cemento, allí genera la conocida laguna de resorción, cumpliendo así su función al extraer el componente inorgánico, pasándolo a la circulación sanguínea y descomponiendo la matriz orgánica del hueso la cual reutiliza y/o exporta a la matriz extracelular, es una célula de gran tamaño 85 a 100 micras aproximadamente, puede incluir hasta 150 núcleos, cobra una significativa importancia en el metabolismo óseo, su función es la resorción ósea, desempeñan importantes funciones en el área de odontología y en procesos patológicos como periodontitis, 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 (5) (8) (9).

En cuanto a la estructura general del osteoclasto se reconocen 3 regiones específicas:

1. Zona clara o zona de sellado: Es un perímetro de citoplasma, contiguo al borde en cepillo, contiene abundantes microfilamentos de actina, estos se hallan organizados en una estructura circular que está rodeada en ambos lados por proteínas de unión a la actina (integrina, vinculina y talina), en esta zona existen moléculas de adhesión célula – MEC que forman el sello apretado entre la membrana celular y la matriz ósea mineralizada. Varias clases de receptores están presentes para mantener el sellado: integrinas como $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ para vitronectina, receptor $\alpha\text{2}\beta\text{1}$ para colágeno o $\alpha\text{v}\beta\text{2}$, al interior de esta zona se forma el borde festoneado o borde en cepillo (10).

2. Borde festoneado o en cepillo: Es la porción del osteoclasto en contacto directo con el hueso; contiene muchos repliegues profundos de la membrana plasmática que forman estructuras de tipo microvellosidades, es una zona altamente permeable encargada de aumentar el área de extensión de esta superficie, para la exostosis de las enzimas hidrolíticas, proteolíticas y secreción de protones por las bombas protónicas 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 (10).

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 (10).

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 (5) (11) (12).

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, y otros autores como Gurdon, Shinya Yanamaka, los cuales demostraron que las células maduras pueden reprogramarse a células pluripotenciales, generándose el concepto de desdiferenciación, 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, así, la plasticidad celular reciente y significativo hallazgo científico 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 (4) (13) (14) (15).

8.2 Resorción ósea

El termino resorción ósea puntualmente hace referencia a la disolución y desintegración del tejido óseo, retirando parte de este de un tejido que conformaba una estructura, al tiempo que se hace la reabsorción del mismo para pasar a circular en sangre en forma de calcio, otros minerales y algunos productos de la degradación de la materia orgánica en el hueso, solo en este momento se realiza la reabsorción; se usa frecuentemente de forma indiscriminada los dos términos resorción y reabsorción, y a nivel óseo se están dando primero resorción y luego reabsorción ya que este segundo término (reabsorción) en el cual se hace referencia al verbo reabsorber quien por su parte refiere absorber nuevamente, puede ser mejor usado en la fisiología renal, en donde la arteria renal lleva sangre que contiene glucosa previamente resorbida y los riñones la reabsorben (resorben nuevamente) (16) (17).

El Doctor Del Nero Vera, médico y odontólogo propone también el término de resorción ósea o dental como una inflamación sobre el tejido mineralizado en el cual hay una desintegración de la matriz orgánica e inorgánica y posterior paso del resultado a la circulación en sangre (18).

También hay otra diferencia con una connotación un poco semántica, en la cual se utiliza el término resorción para la adsorción de estructuras propias del cuerpo, por ejemplo, hueso, tejidos o líquidos propios y reabsorción para agentes externos por ejemplo una sutura reabsorbible (19).

Durante el proceso de resorción ósea la estructura inorgánica debe ser degradada del hueso, la cual, está constituida por una fase mineral de hidroxiapatita, seguida por la degradación de la parte orgánica del hueso formada en su mayoría por colágeno tipo 1 (>90%) y proteínas no colágenas. En la desmineralización del hueso se produce una acidificación del microambiente

extracelular, este proceso es mediado por la enzima vacuolar H⁺-ATPasa (similar a una bomba de protones) localizada en el borde de cepillo que se identifican como entradas y salidas citoplasmáticas especializadas, el cual aumenta su superficie de contacto y se adhiere con este al área ósea que va a ser resorbida. Debido a un abundante transporte de protones por un intercambiador independiente de energía (Cl⁻/HCO₃⁻) sobre la superficie opuesta al borde de cepillo del osteoclasto mediado por la anhidrasa carbonica II (CAII) a partir de CO₂ y H₂O. (19,20). El resultado de este transporte de iones es la secreción de HCl (ácido clorhídrico) en el microambiente de resorción llevando a un pH aproximado de 4.5, sumándose a ello la expresión de enzimas líticas como el TRAP y pro-CATEPSINA K, en un pozo de resorción denominado lagunas de Howship o lagunas de resorción. 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 atreves 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 y sérico; estos productos metabólicos son utilizados como marcadores biológicos que indican resorción ósea (20) (21) (22).

8.3 RANK – RANKL- OPG

Para que el osteoclasto inicie su función resorptiva, debe ser activada por el RANKL (ligando para el receptor activador del factor nuclear κ B), molécula principal involucrada en la activación del osteoclasto 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 κ B), una proteína transmembrana expresada por los osteoclastos, preosteoclastos, 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 (11) (24) (25) (26).

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 (5) (27).

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 $\alpha\beta3$, captasina 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 (27).

Dai y colaboradores 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 (28).

8.4 Resorción ósea y dental en endodoncia

La resorción radicular en la dentición permanente es un proceso patológico que puede ocurrir tanto en el interior del diente (resorción interna) o en la superficie externa del diente (resorción radicular externa). 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 quimios atrayentes para osteoclastos puede reabsorber la dentina adyacente a esta zona produciendo un medio ácido que favorece este proceso patológico. (Kim *et al.*, 2011). 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. (Ahangari., *et al* 2010). 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 intra coronal. También hay algunas resorciones dentales idiopáticas que no encajan en ninguna de las categorías nombradas. (Ahangari., *et al* 2010; Ambu *et al.*,2017).

La resorción radicular externa 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 (Ahangari., *et al* 2010). Este proceso patológico puede tener diferentes causas como infección pulpar o periodontal; dientes impactados, por presión de un tumor, como resultado de la anquilosis dental, traumas siendo la avulsión la más propensa a generar este tipo de patología debido a la reimplantación, otra de las causas son movimientos ortodónticos, especialmente cuando las fuerzas aplicadas para inducir el movimiento de los dientes no están controlados y en estas situaciones la resorción por lo general ocurre en el tercio apical de la raíz. (Jacobs *et al.*, 2014). El diagnóstico debe basarse en una combinación de exámenes radiográficos y clínicos. Las radiografías intra orales 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 reabsorción radicular. (Machado *et al.*,2017; Tzanetakis *et al.*, 2017). 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 reabsorción 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 (4,5,18).

Las alternativas de tratamiento dependerán del tipo y el alcance de la reabsorción 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 de granulación junto con una obturación del defecto de la reabsorción será recomendada. Los medicamentos intraconducto y cementos selladores tales como el MTA, han sido utilizados para tratar de detener el proceso de reabsorción y proporcionar un selle apical en el diente. (Ahangari et al., 2010). 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 reabsorción radicular.

Las opciones de tratamiento incluyen la extirpación pulpar y la colocación de un medicamento intraconducto antiresortivo 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. (Kheirieh et al., 2014) 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. (Fernández et al., 2011).

8.5 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 (Sundstrom and Nilsson 1976); sin embargo, éstas 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 (Kiley et. al., 1997; Kitamura et. al., 2004; Goel et al. 2007; Maia et. al., 2007; Baek, et.al., 2009; Sintiprungrat et. al., 2010), vitamina D3 (Spittler et. al., 1997; Gingras & Margolin, 2000; Baek, et.al., 2009), ácido retinoico (Jiang et. al., 2003) y forskolina (Brodsky et. al. 1998) (39).

8.6 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 es aun 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 (13).

En el laboratorio de biología molecular de la facultad de medicina de la Universidad Nacional 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 determino que al someter células de estas líneas a fuerza centrífuga desarrollaban actividad osteoclastica 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 paquete comerciales (4) (5) (6) (44) (45).

Adicionalmente ha sido publicado desde 2008 por Wei y colaboradores el efecto de las fuerzas centrífugas en cultivos de fibroblastos de ligamento periodontal con potencial de desarrollar expresión de actividad osteoclastica (46).

Desde 1987 un estudio de Lorenzo y colaboradores donde utilizaban la PHA (fitohematoglutinina) como estimulador de CMSP sumado con IL-1 recombinante, y TNF α , encontraron que el efecto de PHA favorecía la síntesis local de IL-1 y ésta media 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, esto sugiere que puede influenciar el metabolismo esquelético normal o anormal (45) (47).

Kotaque 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 y colaboradores encontraron que la PHA activa células T CD4+ y CD8+ humanas y estimula la formación de osteoclastos in vitro por RANKL (44) (49).

8.7 N- acetilcisteína (NAC)

La N-acetilcisteína (NAC, N-acetil-L-cisteína) es del grupo (-CO-CH₃) unido al grupo amino (NH₂) aminoácido L-cisteína además de un acetilo y un nitrógeno lo cual le confiere disminuir ligeramente la característica hidrofílica de la L-cisteína, los aminoácidos que contiene, tienen propiedades antioxidantes, el grupo acetil cisteína la hace más soluble igualmente en agua, facilitando funciones para la absorción y velocidad de distribución al ser ingerida por vía oral. Se considera la NAC segura, incluso en grandes dosis, y es una buena fuente de cisteína (aminoácido) (50).

El átomo de hidrógeno en el sulfidrilo (-SH), molécula anti-oxidante que contienen azufre (tioles) puede actuar como un electrón para neutralizar los radicales libres (50).

El ligando RANKL (factor nuclear kappa β) es esencial para la diferenciación y activación del linaje monocito-macrófago (BMM) a osteoclastos. Se ha demostrado que el RANKL estimula las células

transitoriamente BMM aumentado 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) NADPPH oxidasa (Nox). La aplicación de N-acetilcisteína (NAC) bloquea la actividad de Nox (NADPH oxidasa) y SOD (superóxido dismutasa), proteína que conduce a la formación ROS, inhibiendo la respuestas de las células a BMM al RANKL, incluyendo disminución en la producción de ROS, la activación de la quinasa c-Jun N-terminal (JNK), p38 proteína (MAP) quinasa activada por nitrógeno, la señal extracelular-quinasa regulada (ERK), y la diferenciación de los osteoclastos (7) (9) (51).

En un estudio llevado a cabo por Aitken y colaboradores identifican que la expresión diferencial de TBP-2 (proteína de unión tioredoxina 2) y Trx-1 (tioredoxina) 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, concluye que moduladores del sistema Trx tales como antioxidantes (NAC) tienen potencial como terapias antirresortiva (6).

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

8.8 Propionato de clobetasol

El propionato de clobetasol es un esteroide sintético tópico de alta potencia, análogo de la prednisolona, con efectos antiinflamatorios, antipruriginosos y antiproliferativos. 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, originándose la respuesta antiinflamatoria, antiproliferativa y antipruriginosa. La acción antiinflamatoria del clobetasol al igual que el resto de los corticoesteroides, se debe a la producción y liberación de proteínas como la lipocortina, que inhiben a la fosfolipasa A2 y, por consiguiente, la producción de prostaglandinas y leucotrienos, inhibe la quimiotaxis de macrófagos y neutrófilos, suprimiendo la actividad de los linfocitos y disminuye la permeabilidad vascular. Protege al tejido de la respuesta inflamatoria. La acción antiproliferativa se lleva a cabo

al inhibir la síntesis de DNA y la mitosis de varios tipos celulares; evita la diferenciación de fibroblastos, producción de colágeno, tejido de granulación, tejido conectivo y retarda el proceso de cicatrización. La absorción percutánea del clobetasol como el resto de los esteroides tópicos, está determinada por el sitio de aplicación, vehículo, cantidad aplicada del medicamento, extensión del área tratada, frecuencia de la aplicación, duración del tratamiento, uso de oclusión, estado del tejido a tratar y edad del paciente.

Una vez en plasma, el clobetasol parece seguir la misma vía que el resto de los glucocorticoides; su metabolismo no ha sido bien definido, aunque se piensa que se lleva a cabo en el hígado. Se elimina por vía urinaria junto con sus metabolitos.

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 .

8.9 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 contara con parámetros de diferenciación constantes y confiables para hablar con propiedad de un grupo celular sea cultivado o identificándolo de un tejido in vivo (39) (46) (55) (56).

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 cisteinproteinasas ácida, la catepsina 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. (39) (57) (23).

8.9.1 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 (39) (58) (59).

8.9.2 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 (39) (60) (61).

8.9.3 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. Esta localizada 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 una 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 (39) (62) (63).

8.9.4 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 nocaout 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 (39) (64), (65) .

8.9.5 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 autoregulador de la hipercalcemia (5) (66) (67).

8.9.6 Catepsina K

La cisteína 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 (39) (68) (69).

8.9.7 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 (5)(39)(70).

La enzima TRAP interviene en la degradación de proteínas no colágenas del hueso, sin embargo las fosfatasas 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 ácido resistente a tartrato es detectable en cerumen fisiológico y circunstancias patológicas asociadas al incremento de la resorción ósea. (39)

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 (70).

9. Metodología para el desarrollo de la revisión

9.1 Tipo de estudio

- *Tipo de estudio. Experimental*

9.2 Métodos

- *Preguntas orientadoras*

PREGUNTA PICO

Población o paciente	Cultivo de células U937 (U937, linfoma de histiocitos humano)
Intervención	N-acetilcisteína 30mM pH 6.5 (ampolla)
Comparación	Propionato de clobetasol 0.05 %(crema) Hidróxido de calcio
Outcomes - Resultados	Resorción ósea

¿Existirá mayor o menor efectividad anti resorptiva de la N- acetilcisteína (NAC) en comparación al propionato de clobetasol y el hidrxido de calcio en un modelo in vitro de células fusionadas U937?

9.3 Estructura de la revisión

Se realizó una búsqueda electrónica de la literatura en bases de datos como MEDLINE, EMBASE, y Science Direct. Para la búsqueda se utilizaron encabezados de términos médicos (MeSH), descriptores en ciencias de la salud (DeCS) y palabras claves. Se utilizaron los operadores booleanos OR, AND.

La búsqueda comprendió artículos publicados en revistas indexadas con fechas desde marzo de 1973 hasta enero de 2014. La estrategia de búsqueda completa se estableció para cada base de datos consultada.

9.4 Estructura de estrategia de búsqueda por temática

ESTRUCTURACIÓN DE ESTRATEGIA DE BUSQUEDA

- #1. ("Acetylcysteine"[Mesh]) AND "Osteoclasts"[Mesh]
- #2. ("Clobetasol "[Mesh]) AND "Osteoclasts"[Mesh]
- #3. ("Osteoprotegerin"[Mesh]) AND "Acetylcysteine"[Mesh]
- #4. ("Osteoclasts"[Mesh]) AND "Resortion"[Mesh]
- #5. (("Osteoprotegerin"[Mesh]) OR "Acetylcysteine"[Mesh]))
- #6. (("Osteogenesis"[Mesh]) OR "Acetylcysteine"[Mesh])
- #7. ("Osteoclasts"[Mesh]) OR "Clobetasol"[Mesh]
- #8. (("Bone Resorption"[Mesh]) NOT "Clobetasol"[Mesh]) NOT
- #9. (((("Osteoclast"[Mesh]) AND "Acetylcysteine"[Mesh]) OR "Clobetasol"[Mesh]) OR "Clobetasol"[Mesh])
- #10. (((("Osteoprotegerin"[Mesh]) AND "Acetylcysteine"[Mesh]) AND "Clobetasol"[Mesh])
- #11. (((("Osteoclasts"[Mesh]) OR "Acetylcysteine"[Mesh]) OR "Clobetasol"[Mesh])
- #12. (((("Bone Resorption"[Mesh]) AND "Clobetasol"[Mesh]) AND "Acetylcysteine"[Mesh])

10. Metodología de desarrollo del estudio

- Láminas de hueso

Las láminas de hueso se elaborarán a partir de hueso cortical de tibia y fémur de bovinos; inicialmente, los huesos se cortaran transversalmente con una sierra eléctrica y se lijaron manualmente hasta obtener láminas de hueso con superficies homogéneas con un área de 1cm^2 y un grosor de 0.5 mm. Antes de utilizar las láminas de hueso para realizar los cultivos celulares y el tratamiento con PEG, estas láminas se sumergirán en una solución de SDS al 10% por 8 horas bajo agitación continua, se lavaran doce veces con agua destilada hasta eliminar totalmente el detergente, se esterilizaran con etanol al 70% por 60 minutos, se lavaran dos veces con medio DMEM suplementado con 10% SFB, finalmente se dejaran bajo luz U.V por 1 hora.

- Fusión con PEG

Para la fusión celular, las células U937 serán desprendidas, lavadas tres veces con PBS-EDTA 0.02% sal disódico, serán centrifugadas y re suspendidas en DMEM para contarlas (aproximadamente $1 \times 10^6/\text{ml}$). Se centrifugarán y se eliminará el sobrenadante, luego se colocara el tubo sobre gasa estéril para eliminar todo residuo de DMEM y evitar diluir el polietilenglicol (PEG). Se agregará 50 μl de PEG de peso molecular 3000, previamente calentado a 37°C , se agitará suavemente, mediante golpes con el dedo en la base del tubo, para homogenizar el botón celular en el PEG y se llevará a 37°C durante 5 minutos. A partir de ese momento se adicionarán 40 μl de DMEM cada 60 segundos por 5 minutos, posteriormente 80 μl de DMEM cada minuto durante 5 minutos y 160 μl de DMEM cada minuto durante 5 minutos. Posteriormente las células se centrifugarán y se lavarán dos veces con DMEM para retirar el PEG.

- Siembra y tratamiento con NAC

30 μl (17000 células) de células U937 tratadas o no con PEG en medio de cultivo suplementado con SFB al 10% se sembraran en láminas de hueso colocadas en cajas de 24 pozos por 2 horas para que se adhirieran a la lámina de hueso en una cámara al 5% CO_2 , 95% de humedad a 37°C , después de este tiempo los pozos serán llevados a un volumen final de 400 μl a una concentración de 30mM de NAC, como grupo control se tendrán los pozos en los cuales no se adiciono NAC o

las células que solo se dejaron en medio de cultivo suplementado al 10% SFB, libres de fuerzas compresivas o de tratamiento con NAC.

- Evaluación niveles ROS

Para determinar el nivel de ROS las láminas en donde previamente se sembraron las células U937 serán tratadas con 50 μ l de DHE 50 μ M con hoechst (1:1000) en medio de cultivo por 10 minutos después de este tiempo se fijará con paraformaldehído al 4% por 10 minutos luego las láminas serán lavadas 4 veces con PBS. La lámina ósea se colocará sobre una laminilla porta objetos, sobre las láminas de hueso se colocará una laminilla cubre objetos, se pondrá aceite de inmersión y se observará la Inmunofluorescencia en un microscopio Vanguard® con un objetivo 100x a las 12 horas, 1,2 y 4 días de cultivo. Se tomarán 7 fotos representativas por cada lamina de hueso y los niveles ROS serán determinados en cada fotografía cuantificando la intensidad de fluorescencia con el programa (ImageJ 1.3, Wayne Rasband National Institutes of Health, disponible gratis en <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), los niveles se expresarán en intensidad media de fluorescencia. Los ensayos serán hechos por duplicado y se repetirán dos veces.

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

Se determinarán si las células multinucleadas expresan fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) característica de los osteoclastos. Las células multinucleadas fusionadas se fijarán con una mezcla de etanol/acetona (50:50 v/v), pre-enfriada a 0° C, durante 40 minutos a 4 °C. Posteriormente las células se colocarán en pararosanilina hexazotizada con tartrato (2,8 gr. / mL) con nitrito de sodio en buffer veronal utilizando naftol fosfato ASB1 (Sigma) como sustrato y se adicionará tartrato de sodio (28 mg/10 ml) , se ajustará el pH a 5.2. Posteriormente se dejarán a 37 °C durante 3 h, se lavarán en PBS, y el número de células fusionadas (más de tres núcleos) TRAP positivos serán identificadas por el color rojizo, estas se contarán en el microscopio de luz con un objetivo 40 X. Para su evaluación se contarán las células totales TRAP+ (rojas ladrillo) y se dividirán respecto al área del hueso (determinada con un conteo de campos en el objetivo 40X multiplicado por 0,16 mm²) y de esta manera se podrán determinar las células TRAP+ por área de hueso. Posteriormente se realizará un registro de fotografías con cámara digital (Cannon S70).

- Evaluación de la actividad resorptiva.

Las células una vez tratadas como se describió anteriormente, se sembrarán sobre láminas de hueso cortical bovino estériles de 0.5 mm de espesor. Como control experimental se evaluará 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 adicionará buffer de lisis RIPA durante 120 minutos. Para eliminar los residuos celulares o células no lisadas del hueso se frotará cuidadosamente con un cepillo dental de cerdas suaves. El hueso se teñirá con hematoxilina durante 5 minutos, se dejarán secar y luego se colorearán con azul de Commassie durante 30 minutos (en caso de haber sobre coloración del hueso, éste se decolorará 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 observarán al microscopio óptico y se tomarán fotografías con cámara digital (Cannon S70). El extendido de la resorción de cada fotografía se evaluará mediante un programa computacional de análisis de imágenes (ImageJ 1.3, Wayne Rasband National Institutes of Health, disponible gratis en <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) y se expresará en porcentaje total de área resorbida. Los ensayos serán hechos por duplicado y se repetirán dos veces.

$$\text{Porcentaje de resorción} = \frac{\text{Área total resorbida}}{\text{Área total del hueso}} \times 100.$$

- Análisis de marcadores osteoclasticos

Para analizar la presencia de anillos de actina como indicadores de actividad osteoclastica, las células U937 tratadas con agentes reductores y oxidantes antes y después de la fusión con PEG, después de 4 días de cultivo, serán fijadas con paraformaldehído al 4% y se permeabilizarán con 0.1% TRITON X por 5 minutos, luego se lavarán con PBS; posteriormente se aplicará una solución de 0.1% de saponina, 0.2% de ovoalbumina por 30 minutos a 37°C, finalmente se les aplicará 1 µg/ml Falloidina y 0,0016 mg/ml Hoechst 33342 durante 30 minutos a 37°C y se lavarán 3 veces esperando 5 minutos entre lavado con PBS que contiene 0.05% de azida y 50mM de NH₄Cl.

La lámina de hueso se colocará sobre una laminilla para ser observada en un microscopio invertido (KAIKA®), con un objetivo de 40X con filtro de fluorescencia verde y azul. Se tomarán 10 fotos representativas por cada lámina de hueso y se evaluará el número de osteoclastos que presentaron anillos de actina. Se realizará por triplicado en experimentos independientes.

En las células U937 tratadas con agentes reductores y oxidantes antes y después de la fusión con PEG, se determinara la expresión de marcadores osteoclastogénicos de los grupos que tuvieron mejor eficacia en la alteración de la resorción ósea y en los controles (células U937 fusionadas con PEG y sin PEG); para esto se analizaran las proteínas de diferenciación NFκB, NFATc1; de fusión ERVW-1, CD47, DC STAMP, OC STAMP, ADAM 12, CDH1, Cx 43; de Actividad resorptiva TRAP, CTSK, MMP9, V-ATPase A1, CA2, α V β 3, de diferenciación: VDAC1 y CT; y NOX como enzima productora de ROS, se realizara una inmunofluorescencia indirecta. Se realizara el cultivo de la manera anteriormente descrita durante 24, 48, 72 y 96 h, para evaluar los distintos marcadores según la tabla 1, se fijaran con paraformaldehído al 4%, para los marcadores intracelulares se permeabilizaran con 0.1% TRITON X por 5 minutos y se lavaran con PBS, para los marcadores de membrana no se permeabilizara, posteriormente se aplicara una solución de 0.1% de saponina, 0.2% de ovoalbúmina que contendrá el anticuerpo primario señalado en la tabla 1 durante toda la noche a 4°C se lavara cinco veces con PBS que contendra 0.05% de azida y 50mM de NH₄Cl. Se incubarán a 4°C durante 30 minutos con los anticuerpos secundarios policlonales conjugados con fluoresceína 5 isotiocianato (FITC, 1μg/ml, Santa Cruz Biotechnology) y 0,0016mg/ml Hoechst 33342 (thermo scientific), en total oscuridad y se lavarán 5 veces con PBS.

Los grupos control (células U937 fusionadas con PEG y sin PEG) se incubarán con los mismos anticuerpos. Estos ensayos se realizarán por duplicado.

La lámina de hueso se colocará sobre una laminilla para ser observada en un microscopio invertido (KAIKA®), con un objetivo de 40X con filtro de fluorescencia verde y azul. Se tomarán 10 fotos representativas por cada lámina de hueso y los niveles de las proteínas seran determinados en cada fotografía cuantificando el porcentaje de células positivas para FITC y la intensidad media de fluorescencia con el programa ImageJ (Wayne Rasband National Institutes of Health) y expresados en términos de Fluorescencia celular total corregida CTCF.

11 .Referencias bibliográficas

- 1.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: 345-57.
2. Faust J, Lacey DL, Hunt P, Burgess TL, Scully S, Van G, Eli A, Qian Y, Shalhoub V. Osteoclast markers accumulate on cells developing from human peripheral blood mononuclear precursors. *J Cell Biochem.* 1999. Jan 1;72(1):67-80. .
3. Edwards JR, Sun SG, Locklin R, Shipman CM, Adamopoulos IE, Athanasou NA, Sabokbar A. LIGHT (TNFSF14), a novel mediator of bone resorption, is elevated in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006. May;54(5):1451-62.
4. Murillo A, Guerrero C, Acosta O, Cardozo C. Bone resorptive activity of osteoclast-like cells generated in vitro by PEG-induced macrophage fusión. *Biol Res* 2010, 43: 205:224.
5. Aitken CJ, Hodge JM, Nishinaka Y, Vaughan T, Yodoi J, Day CJ, Morrison NA, Nicholson GC. Regulation of human osteoclast differentiation by thioredoxin binding protein-2 and redox-sensitive signaling. *J Bone Miner Res.* 2004 Dec;19(12):2057-64.
6. Lee NK, Choi YG, Baik JY, Han SY, Jeong DW, Bae YS, Kim N, Lee SY. A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation.. *Blood.* 2005 Aug 1;106(3):852-9.
7. Qin A et al. V-ATPases in osteoclasts: Structure, function and potential inhibitors of bone resorption *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44 (2012) 1422– 1435.
- 8.Suda, T, Takahashi, N., and Martin, T.J. Modulation of osteoclast differentiation. *Endo. Rev.* 1992-; 13: 66–80.
9. Lensch MW, Mummery CL. From stealing fire to cellular reprogramming: a scientific history leading to the 2012 nobel prize. *Stem Cell Reports.* 2013 Jun 4;1(1):5-17
10. Roodman G. David . Cell biology of the osteoclast. 1999 *Experimental Hematology.* 1999, 27: 1229–1241.

11. Anderson RE, Woodbury DM. Humoral and ionic regulation of osteoclast acidity. *Calcif Tissue Int.* 1986 oct; 39 (4):252-8.
12. Anne Fouque-Aubert*, Roland Chapurlat. Influence of RANKL inhibition on immune system in the treatment of bone diseases. *Joint Bone Spine.* 2008 Jan;75(1):5-10.
13. Cheng ML, Fong L. Effects of RANKL-targeted therapy in immunity and cancer. *Front Oncol.* 2014 Jan 7;3:329
14. Kalajzic Z, Peluso EB, Utreja A, Dymant N, Nihara J, Xu M, Chen J, Uribe F, Wadhwa S Effect of cyclical forces on the periodontal ligament and alveolar bone remodeling during orthodontic toothmovement. *Angle Orthod.* 2014 Mar;84(2):297-303
15. Gunraj M. Dental root resorption. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999;88:647-53
16. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science.* 2010 Feb 5; 327(5966):656-61.
17. 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 il. 1164-70., s.l. : *Endocrinology*, 1987 Sep, Vol. 121(3)
18. Jussi MH, Seija R, Jari JS, Sakamuri VR. David RT, Hentunen, Petri PL, 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):
19. Boni, L. T., Stewart, T. P., Alderfer, J. L., and Hui, S. W. 1981. Lipidpolyethylene glycol interactions. II. formation of defects in bilayers. En: *J. Membr. Bio.* Vol. 62,. p. 71-77
20. Hui, S.W., Kuhl, T.L., Guo, Y.Q, Israelachvili, J. 1999. Use of poly (ethylene glycol) to control cell aggregation and fusion. En: *Coll. Surf. B. Bioin.* Vol. 14,. p. 213–222.
21. Wojcieszyn, J.W,. et al. Studies on the Mechanism of Cell Fusion Using Fluorescent Probes Polyethylene Glycol-mediated Membrane and Cytoplasmic. En: *J. Cell biology.* 1983; 96: 151-159.

22. Abu-Amer Y. Advances in osteoclast differentiation and function. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*. 2005 Sep;5(3):347-55
23. Charles T, Frost H. M. Bone remodeling and its relationship to metabolic bone disease. Springfield, MA. 1973
24. Yao, G.F. et al. Characterization of vacuolar-ATPase and selective inhibition of vacuolar-H(+)-ATPase in osteoclasts. *En: Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; 357 (4): 821 – 827
25. Chellaiah M. Regulation of podosomes by integrin $\alpha\beta3$ and Rho GTPase-facilitated phosphoinositide signaling Review Article *European Journal of Cell Biology*. 2006 Abril; 85 (3–4): 311-317
26. Quinn J, Morfis M, Lam H, Elliot J, Kartsogiannis E, Williams E, Gillespie M, Martin T, Sexton P. Calcitonin Receptor Antibodies in the Identification of Osteoclasts. *Bone* 1999;25 (1): 1-8
27. Muñoz M, GARCÍA R. Catepsina K y resorción ósea. *Rev Esp Enferm Metab Oseas*. 2006;15:88-9. - vol.15 núm 04
28. Lecaille F, Bromme D, Lalmanach M. Biochemical properties and regulation of cathepsin K activity. *Biochimie* 90 (2008) 208e226
29. Hayman, Purification and characterization of a Tartrate-Resistant Acid Phosphatase from human osteoclastomas. *Biochem. J.* 1989. 261: 601-609.
30. Hamrstrom L, Lindskog. General morphologic aspects of resorption of teeth and alveolar bone. *Int Endod* 1985. 18, 93-108
31. Zafarullah. M. W. Q. Li, Sylvester J. Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* January 2003. 60; pp 6-20
32. Aitken CJ1, Hodge JM, Nishinaka Y, Vaughan T, Yodoi J, Day CJ, Morrison NA, Nicholson GC. Regulation of human osteoclast differentiation by thioredoxin binding protein-2 and redox-sensitive signaling. *J Bone Miner Res*. 2004 Dec;19(12):2057-64.

33. Anna Kirakozova, DDS, MS*,*, 'Correspondence information about the author DDS, MS Anna Kirakozova Email the author DDS, MS Anna Kirakozova, Fabricio B. Teixeira, DDS, MS, PhD†, Alice E. Curran, DMD, MS‡, Fang Gu, BDS, MS, PhD*, Peter Z. Tawil, DMD, MS, FRCD(C)*, Martin Trope, DMD, MS* Effect of Intracanal Corticosteroids on Healing of Replanted Dog Teeth after Extended Dry Times
34. Beltrán Moreno Pedro José, Evaluación del efecto antiresortivo de nac en células similares a osteoclastos obtenidas por fusión con peg o por fuerza centrífuga. Universidad Nacional De Colombia
35. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003;423(May):337-342.
36. Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, et al. The Ligand for Osteoprotegerin (OPGL) Directly Activates Mature Osteoclasts. *J Cell Biol*. 1999;145(3):527-538.
37. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin : A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density. *Cell*. 1997;89:309-319.
38. Li J, Sarosi I, Yan X, et al. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(4):1566-1571.
39. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*. 1999;397(6717):315-323. doi:10.1038/16852.
40. Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998;93(2):165-176. doi:10.1016/S0092-8674(00)81569-X.
41. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res*. 2000;15(1):2-12. doi:10.1080/14041040009362546.
42. Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin: Paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(4):549-553. doi:10.1161/01.ATV.0000012303.37971.DA.

43. David J-P, Sabapathy K, Hoffmann O, Idarraga MH, Wagner EF. JNK1 modulates osteoclastogenesis through both c-Jun phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 22):4317-4325. doi:10.1242/jcs.00082.
44. Mensah K a., Ritchlin CT, Schwarz EM. RANKL induces heterogeneous DC-STAMPlo and DC-STAMP^{hi} osteoclast precursors of which the DC-STAMPlo precursors are the master fusogens. *J Cell Physiol.* 2010;223(November):76-83. doi:10.1002/jcp.22012.
45. Hobolt-Pedersen AS, Delaiss?? JM, S??e K. Osteoclast fusion is based on heterogeneity between fusion partners. *Calcif Tissue Int.* 2014. doi:10.1007/s00223-014-9864-5.
46. Gong R, Peng X, Kang S, et al. Structural characterization of the fusion core in syncytin, envelope protein of human endogenous retrovirus family W. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;331(4):1193-1200. doi:10.1016/j.bbrc.2005.04.032.
47. Saginario C, Qian HY, Vignery a. Identification of an inducible surface molecule specific to fusing macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(26):12210-4.
48. Chen EH, Grote E, Mohler W, Vignery A. Cell-cell fusion. *FEBS Lett.* 2007;581(11):2181-2193. doi:10.1016/j.febslet.2007.03.033.
49. Ishii M, Saeki Y. Osteoclast cell fusion: mechanisms and molecules. *Mod Rheumatol.* 2008;18(3):220-227. doi:10.1007/s10165-008-0051-2.
50. Yagi M, Miyamoto T, Sawatani Y, et al. DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. *J Exp Med.* 2005;202(3):345-351. doi:10.1084/jem.20050645.
51. Yang M, Birnbaum MJ, MacKay C a, Mason-Savas A, Thompson B, Odgren PR. Osteoclast stimulatory transmembrane protein (OC-STAMP), a novel protein induced by RANKL that promotes osteoclast differentiation. *J Cell Physiol.* 2008;215(2):497-505. doi:10.1002/jcp.21331.
52. Miyamoto H, Suzuki T, Miyauchi Y, et al. Osteoclast stimulatory transmembrane protein and dendritic cell-specific transmembrane protein cooperatively modulate cell-cell fusion to form osteoclasts and foreign body giant cells. *J Bone Miner Res.* 2012;27(6):1289-1297. doi:10.1002/jbmr.1575.
53. Kim MS, Day CJ, Morrison N a. MCP-1 is induced by receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, promotes human osteoclast fusion, and rescues granulocyte macrophage colony-

stimulating factor suppression of osteoclast formation. *J Biol Chem.* 2005;280(16):16163-16169. doi:10.1074/jbc.M412713200.

54. Miyamoto K, Ninomiya K, Sonoda KH, et al. MCP-1 expressed by osteoclasts stimulates osteoclastogenesis in an autocrine/paracrine manner. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;383(3):373-377. doi:10.1016/j.bbrc.2009.04.020.

55. Lee J, Lentz BR. Evolution of lipidic structures during model membrane fusion and the relation of this process to cell membrane fusion. *Biochemistry.* 1997;36(21):6251-6259. doi:10.1021/bi970404c.

56. Wu JR, Lentz BR. Mechanism of poly(ethylene glycol)-induced lipid transfer between phosphatidylcholine large unilamellar vesicles: a fluorescent probe study. *Biochemistry.* 1991;30(27):6780-6787. doi:10.1021/bi00241a022.

57. Kitaura H, Kimura K, Ishida M, Sugisawa H, Kohara H. Effect of Cytokines on Osteoclast Formation and Bone Resorption during Mechanical Force Loading of the Periodontal Membrane Effect of Cytokines on Osteoclast Formation and Bone Resorption during Mechanical Force Loading of. *Sci World J.* 2016;2014(January 2014):1-7. doi:10.1155/2014/617032.

58. Steeve KT, Marc P, Sandrine T, Dominique H, Yannick F. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: Interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;49-50.

59. Kook S, Young-ok, Hwang J, et al. Mechanical Force Inhibits Osteoclastogenic Potential of Human Periodontal Ligament Fibroblasts Through OPG Production and ERK-Mediated Signaling. *J Cell Biochem.* 2009;1019(January 2008):1010-1019. doi:10.1002/jcb.22086.

60. Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci.* 2003;6-20. doi:10.1007/s000180300001.

61. Winterbourn CC, Metodiewa D. Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med.* 1999;27(3-4):322-328. doi:10.1016/S0891-5849(99)00051-9.

62. Takahashi N, Udagawa N, Kobayashi Y, Suda T. Generation of osteoclasts in vitro, and assay of osteoclast activity. *Methods Mol Med.* 2007;135:285-300.

63. Hayman AR. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. *Autoimmunity.* 2008;41(3):218-223. doi:10.1080/08916930701694667.

64. Jurdic P, Saltel F, Chabadel A, Destaing O. Podosome and sealing zone: Specificity of the osteoclast model. *Eur J Cell Biol.* 2006;85(1):195-202. doi:10.1016/j.ejcb.2005.09.008.
65. Destaing O, Saltel F, Géminard J-C, Jurdic P, Bard F. Podosomes Display Actin Turnover and Dynamic Self- Organization in Osteoclasts Expressing Actin-Green Fluorescent Protein V. *Mol Biol Cell.* 2003;14:407-416.doi:10.1091/mbc.E02.