



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**“DIFERENCIACIÓN *IN VITRO* DE OSTEOCLASTOS DE POLLO
MEDIANTE EL CULTIVO CON CSF1 Y RANKL, Y ANOTACIÓN
FUNCIONAL DE GENES”.**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

BIOTECNÓLOGO

PRESENTA

ARGELIA SARAHÍ GARCÍA CERVERA

ASESORA

DOCTORA CARLA GARCÍA MORALES

COASESORA

MIRIAM VERÓNICA FLORES MERINO



Índice de contenido

Resumen	4
1. Introducción	5
1.1 Tejido óseo	5
1.2 Remodelación ósea	5
1.3 Fijación ósea	6
1.4 Reabsorción ósea	7
1.6 CSF1 y RANKL	9
1.6.1 CSF1	9
1.6.2 RANKL	10
1.7 Enfermedades del tejido óseo	12
1.8 El modelo del pollo en estudio de osteoclastogénesis	13
1.9 Estudios de expresión génica a gran escala	14
2. Justificación	16
3. Objetivos	16
3.1 Objetivo general	16
4. Hipótesis	16
5. Materiales y métodos	16
5.1 Cultivo de células	16
5.1.1 Obtención y proliferación de células precursoras monocíticas	16
5.1.2 Optimización de condiciones de cultivo para obtención de células multinucleadas	17
5.1.3 Microscopía y tinción de GIEMSA y fluorescente	18
5.2 Microarreglo	19
5.2.1 Análisis cualitativo del microarreglo de RNA	19
5.2.2 Anotación funcional	20
6. Resultados y discusión	20
6.1 Cultivo de células	20
6.1.1 Obtención y proliferación de células precursoras monocíticas	20
6.1.2 Optimización de condiciones de cultivo para obtención de células multinucleadas	21
6.1.3 Microscopía y tinción de GIEMSA y fluorescente	25
6.2 Microarreglo	27
6.2.1 Análisis cualitativo del microarreglo de RNA	27
6.2.2. Anotación funcional	30
7. Conclusiones	36
8. Perspectivas	37
9. Bibliografía	38

Listado de abreviaturas

CPM	Células precursoras monocíticas
CSF1	Factor estimulador de colonias (colony stimulating factor 1)
MAC	Macrófago
MO	Médula ósea

OST	Osteoclasto
PBS	Solución balanceada de fosfatos (phosphate balanced solution)
RANK	Receptor activador del factor Nk- β (receptor activator of Nk- β)
RANKL	Ligando del receptor activador del factor Nk- β (receptor activator of Nk- β ligand)

Índice de figuras

Figura 1.1. Estructura jerárquica del hueso.	5
Figura 1.2. El tejido óseo y zonas de fijación y reabsorción.	6
Figura 1.3. Esquemización de las moléculas más importantes involucradas en la reabsorción ósea.	7
Figura 1.4. Moléculas importantes involucradas en la diferenciación de OST.	8
Figura 1.5. Reguladores importantes involucrados en la ruta activada por RANKL.	11
Figura 1.6. Hueso sano (izquierda) y hueso osteoporótico (derecha).	12
Figura 1.7. Esquema de un microarreglo.	14
Figura 5.1. Plato de valoración.	18
Figura 6.1 . Micrografía del cultivo inicial de MO en CSF1.	20
Figura 6.2. Diferenciación de CPM.	23
Figura 6.3. Macrófago vs célula multinucleada.	24
Figura 6.4. MAC y OST.	25
Figura 6.5. Gráfico de caja y bigotes de los datos del número de núcleos provenientes de MAC y OST.	26
Figura 6.6. Gráfico de caja y bigotes de los datos de expresión.	27
Figura 6.7. Gráficos generados con BiLayout 3D.	28
Figura 6.8. Mapa de calor de MAC (CSF1) y OST (RANKL).	29
Figura 6.9. Gráfico de dispersión de la expresión promedio de las muestras de CSF1 y RANKL.	30

Índice de tablas

Tabla 6.1. Listado de veinte genes enriquecidos en OST y MAC	31
Tabla 6.2. Registro de la búsqueda de las sondas de acuerdo a la herramienta de búsqueda empleada	33
Tabla 6.3. Resultados obtenidos de la búsqueda BLAST de Ensembl.com en varias especies para las sondas 15475342, 15475339, y 15475341.	35
Tabla 6.4 Resultados obtenidos de la búsqueda BLAST de Ensembl.com en varias especies para la sonda 15387860.	35

Resumen

Los osteoclastos (OST) son células multinucleadas móviles de gran tamaño cuya función es reabsorber hueso. Su diferenciación es un proceso complejo que involucra la fusión entre tres o más precursores mononucleados y la posterior fijación al hueso. Las rutas moleculares que inciden en la diferenciación de los OST se han estudiado desde que se encontró que en ratón el co-cultivo de células estromales con médula ósea o con células del bazo daban como resultado OST. Debido a su importancia en la homeóstasis del hueso, su estudio resulta fundamental para la comprensión de los mecanismos de enfermedades óseas, como la osteoporosis o la osteopetrosis, A pesar del impacto que tienen estas enfermedades en la calidad de vida, particularmente la osteoporosis; los estudios hechos en OST hasta ahora, sólo se han llevado a cabo mediante la obtención de OST *in vitro* lavados directamente del hueso, de precursores de médula ósea cultivados sobre cortes de hueso, y más recientemente adicionando CSF1 y RANKL; únicamente a precursores de sangre periférica de humano, y a precursores en médula ósea de ratón; sin considerar las ventajas intrínsecas de efectuar la diferenciación *in vitro* en otros modelos de estudio ni las desventajas de las técnicas existentes. Aunque el genoma del pollo se encuentra completamente secuenciado, hasta el momento la anotación continúa siendo pobre, por lo que los estudios genéticos y moleculares en el pollo donde se empleen técnicas que permitan analizar la expresión de varios genes simultáneamente, tales como los microarreglos, requerirán de una anotación apropiada para su análisis. Efectuar una buena anotación es importante porque permite determinar si en la secuencia que se analiza existe un gen conocido, identificar la conservación de genes y vías de señalización entre organismos; para así poder extrapolar los resultados obtenidos a otras especies.

El presente estudio tiene como objetivo diferenciar *in vitro* células precursoras monocíticas de médula ósea en OST de pollo, así como realizar anotación funcional de varios genes expresados en OST; a fin de identificar genes específicos que pudieran en un futuro ser propuestos como blancos terapéuticos para enfermedades como la osteoporosis o la osteopetrosis. Para ello se optimizaron las condiciones requeridas para la producción de OST y MAC de pollo *in vitro*, posteriormente se realizó un microarreglo de ambos cultivos. Los datos devueltos por el microarreglo, se organizaron en función a los radios de expresión promedio entre ambos grupos. Se encontraron genes específicos de osteoclastos con homología en el pollo y otros organismos. Curiosamente, se encontraron marcos de lectura abierto enriquecidos en OST, sin embargo éstos presentan homología con los genomas de aves y no con los genomas del humano o del ratón.

1. Introducción

1.1 Tejido óseo

El hueso es un tejido que conforma las vértebras y el esqueleto de un organismo, compuesto por una fase mineral de hidroxapatita, y una fase orgánica de colágeno tipo I, proteínas no colágenas, lípidos y agua (Figura 1.1); su función principal consiste en dar soporte interno al organismo (Boskey, 2013), sin embargo también se encarga de proteger órganos internos, proveer de grasas y minerales a tejidos circundantes (Seibel *et. al*, 2006), y ser fuente de células madre hematopoyéticas (Colville y Bassert 2015).

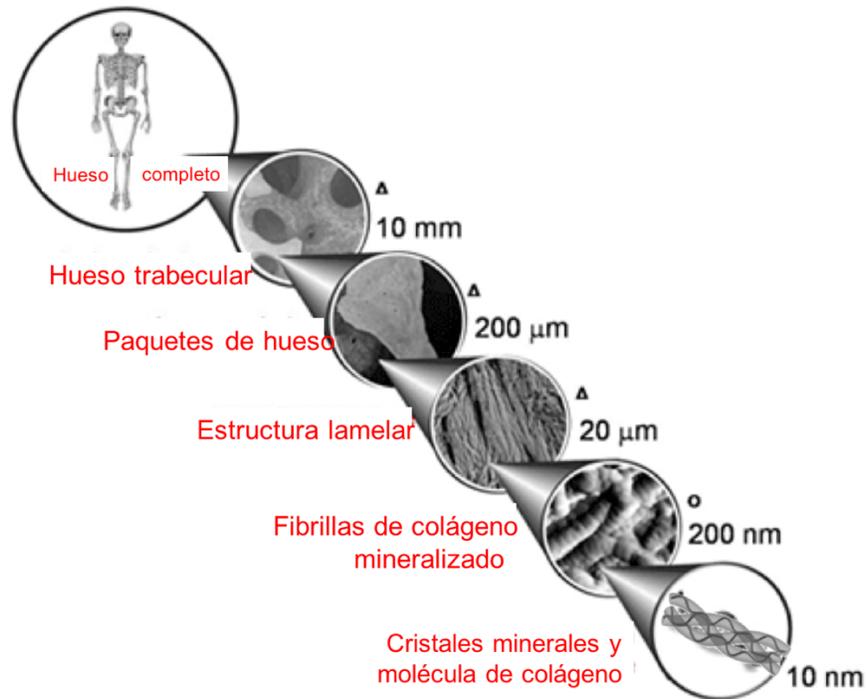


Figura 1.1. Estructura jerárquica del hueso. Se describen los componentes del tejido a varios niveles. Modificada de (UNISA, 2012)

1.2. Remodelación ósea

Para que el hueso pueda llevar a cabo su función adecuadamente, debe estar en constante remodelación. El proceso de remodelación ósea consiste en la fijación y reabsorción alterna del tejido, (Schindeler *et. al*, 2008). La remodelación del tejido óseo es un proceso altamente sinérgico que involucra la fijación de hueso mineralizado por los osteoblastos y la reabsorción de hueso mediado por los osteoclastos (Georgess *et. al*, 2014); este proceso permite la reparación el hueso, previniendo la acumulación de hueso viejo o deteriorado, lo que mantiene la forma, el tamaño y la calidad dicho tejido (Hadjidakis y Androulakis 2006).

La remodelación de hueso a nivel fisiológico también comprende la elongación de los huesos largos, en donde se fija hueso más rápidamente de lo que se absorbe. Un hueso largo en desarrollo consiste en las epífisis, metáfisis, (cabezas del hueso, Figura 1.2) y las diáfisis entre éstos. Las epífisis son responsables del crecimiento transversal y esférico de los extremos del hueso, de la forma de las superficies de las articulaciones, y del crecimiento longitudinal de la metáfisis y de la diáfisis, aunque una pequeña cantidad del crecimiento longitudinal ocurre gracias a la expansión

intersticial del cartílago epifiseal. Las placas de crecimiento que se encuentran en los extremos de los huesos llevan a cabo una secuencia de procesos celulares como proliferación, síntesis de matriz extracelular, hipertrofia celular, invasión vascular, y apoptosis, las cuales conducen al crecimiento longitudinal del hueso y a la formación (fijación) de hueso en la región físea y metafísea, además de abarcar la osificación endocondral, donde prevalecen células como los osteoblastos, los condroblastos y los osteocitos (Saphiro, 2008).

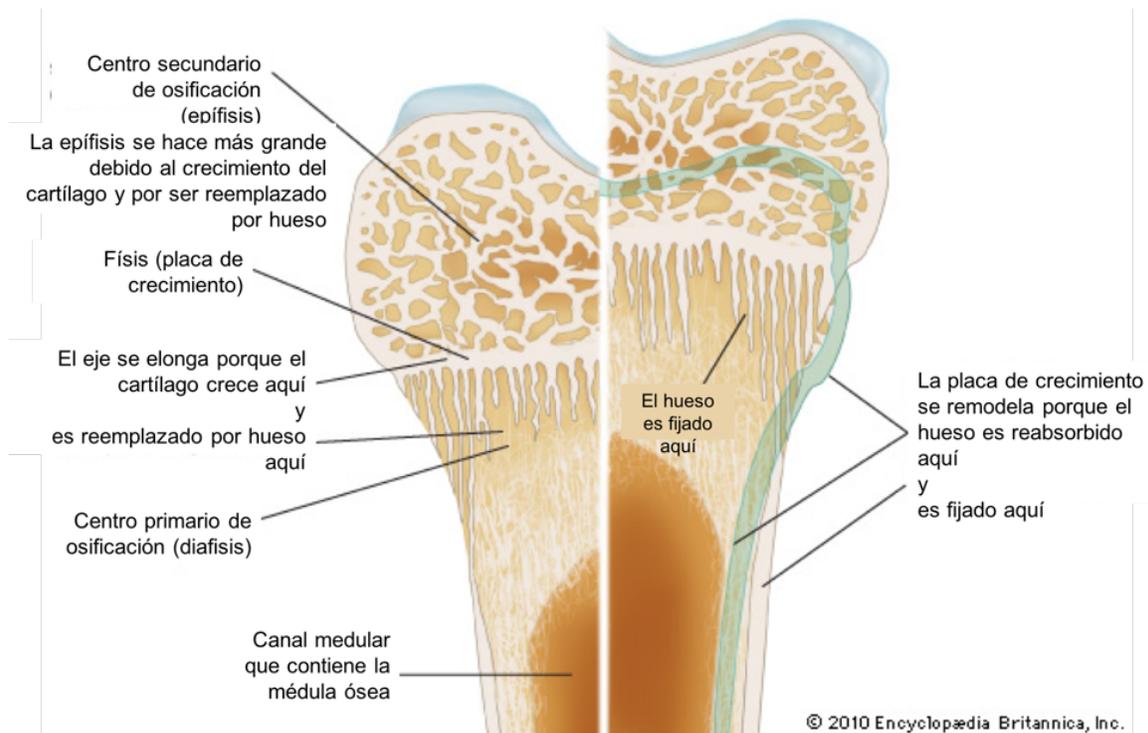


Figura 1.2. El tejido óseo y zonas de fijación y reabsorción. Antes (izquierda) y después (derecha) del proceso de elongación del hueso. Se describen las zonas donde ocurre la fijación y la reabsorción de hueso, lo que dará lugar al crecimiento del hueso. Modificado de (EB, s.f.)

1.3 Fijación ósea

En el proceso de formación de hueso existen dos mecanismos principales. La **osificación intramembranosa** ocurre cuando células mesenquimales se diferencian en osteoblastos, este tipo de osificación ocurre principalmente en los huesos del cráneo.

El otro proceso se conoce como **osificación endocondral**, y consiste en células mesenquimales que se diferencian en condrocitos para luego ser reemplazados por hueso (Gilbert, 2000). Los condrocitos depositan una matriz extracelular específica de cartílago, proliferan, entran en hipertrofia y mueren; y en aquellas zonas con condrocitos hipertróficos, algunas células mesenquimales se diferencian en osteoblastos, los cuales depositan una matriz extracelular específica de hueso, que reemplaza la matriz cartilaginosa (Nakashima *et. al*, 2002). Se sabe que para dicho propósito, los osteoblastos sintetizan colágeno tipo I, osteonectina, osteopontina, sialoproteína ósea, y osteocalcina, además poseen alta reactividad ante la hormona paratiroidea y el factor de crecimiento epidérmico (Aubin *et. al*, 1995). Se ha sugerido que los condrocitos y los osteoblastos derivan de un mismo precursor (Fang y Hall, 1997).

1.4 Reabsorción ósea

La reabsorción del hueso consiste en la degradación de materia orgánica y mineral presente en el tejido óseo, consta de tres procesos principales; fijación, desmineralización, y absorción de materia orgánica. Estos procesos son mediados por los osteoclastos (OST), y comienza con la generación de una **célula multinucleada**, que gracias a la acción de integrinas expresadas en los OST se adhiere a la matriz ósea (Davies *et.al*, 1989) y sufre una reorganización citoesquelética activada por la **integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$** que generará un **borde rugoso** en la membrana (Reinholt *et. al*, 1990), y debajo de éste se formará la llamada **zona aislada**, circundada por un anillo de F-actina, el cual asegura una unión fuerte al tejido, sitiando la zona de tejido que va a reabsorberse (Kubatzky *et. al*, 2013).

La desmineralización se lleva a cabo mediante la acidificación de la zona aislada mediante la expulsión de protones hacia ésta por una **ATPasa translocadora** ubicada en el borde rugoso; este proceso promueve la solubilidad de la hidroxiapatita y genera un pH ideal para el funcionamiento de hidrolasas lisosómicas (Murray, 2009); adicionalmente la proteasa lisosomal Catepsina K (**CSTK**) degrada componentes orgánicos presentes en el hueso, en su mayoría colágeno (Young, 2003). Al final de la reabsorción, los OST migran gracias a la extensión del anillo de **F-actina** (Saltel *et. al*, 2004) dejando una estructura llamada **lacuna** o **lacuna de Howship**, señal de que la reabsorción se llevó a cabo (Hadjidakis y Androulakis 2006). Al finalizar el proceso de reabsorción, los OST migran a otra sección del tejido por extensión de los podosomas (Saltel *et. al*, 2004) estructuras de actina que predefinen el anillo de actina que sellará la **zona aislada** (Linder and Aepfelbacher, 2003), (Figura 1.3).

La materia orgánica y el calcio reabsorbido por el OST son transferidos a los capilares dentro del hueso, por lo que suelen emplearse como marcadores en el plasma sanguíneo y en la orina para detectar enfermedades óseas comunes como osteoporosis o enfermedad de Paget (Delmas *et. al*, 2000). Sin embargo también son útiles para detectar algunas enfermedades no relacionadas con el hueso, como diabetes tipo II (Reyes- García *et. al*, 2013), falla renal (Rix *et. al*, 1999), lupus (Teichmann *et. al*, 1999), cáncer de próstata (Kamiya *et. al*, 2010), entre otras enfermedades

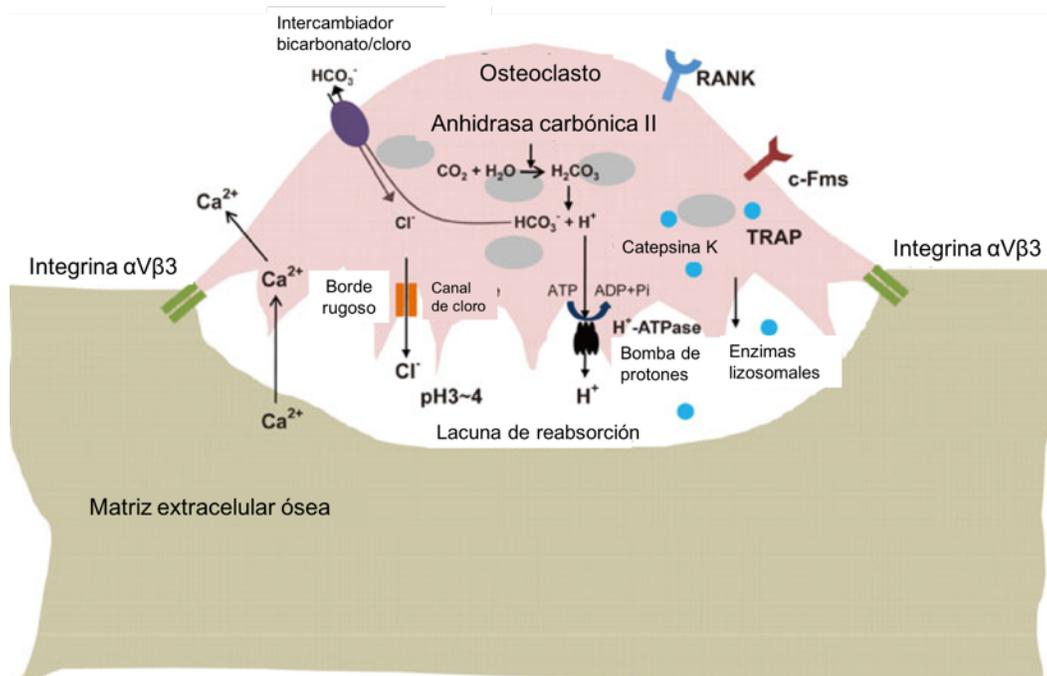


Figura 1.3. Esquemización de las moléculas más importantes involucradas en la reabsorción ósea. Traducida de: (Lee, 2010).

1.5 Osteoclastos y osteoclastogénesis

Los OST son células móviles de hasta 100 μm (Jain y Weistein, 2009) que pueden contener desde tres hasta cien o más núcleos (Diepenhorst *et. al*, 2017). Su función consiste en la reabsorción de tejido óseo en el desarrollo y remodelación de dicho tejido, así como en la erupción dental (Xu y Teitelbaum, 2013; Teitelbaum, 2000), se encuentran en la superficie del endostio y periostio (Hakeda y Kumewaga, 1991). Proviene del linaje hematopoyético, y su diferenciación comprende la fusión de uno o más precursores mononucleares hematopoyéticos con características del linaje de los macrófagos, y finalmente la fijación a la matriz ósea (Boyle *et. al*, 2003).

Se han estudiado las rutas moleculares que participan en la diferenciación de los OST u osteoclastogénesis desde que se encontró que el co-cultivo de células estromales de ratón con células de médula ósea o células del bazo daban como resultado OST (Takahashi, 1988 a). Ahora se sabe que la osteoclastogénesis ocurre por la acción de dos factores hematopoyéticos; el Factor Estimulador de Colonias 1 (**CSF1**), secretado por todas las células mieloides de linaje mononuclear fagocítico (Pixley y Stanley, 2004) y por los osteoblastos (Hume y MacDonald, 2012), cuya función es promover la proliferación de los precursores mononucleares; y el Ligando del Receptor Activador del factor NF- κB (**RANKL**) secretado por los osteoblastos (Singh *et. al*, 2012), el cual promueve la fusión de dichos precursores (Dou *et. al*, 2016).

Entre los genes que caracterizan a los OST funcionales se encuentran: Fosfatasa Ácida 5 (**ACP5**) que resulta en la expresión de la enzima **TRAP** (Fosfatasa Ácida Resistente a Tartrato) la cual además de tener actividad fosfatasa, es esencial para la lisis del colágeno I al generar radicales libres (Hayman, 2008; Ek-Rylander, B., y Andersson, G., 2010); **CTSK** que codifica para la proteasa catepsina K, responsable de degradar el telopéptido y las regiones con triple hélice presentes en el colágeno I, (Gowen *et. al*, 1999; Lotinun *et. al*, 2013); **CALCR**, el receptor de calcitonina el cual al activarse inhibe la reabsorción y la motilidad (Turner *et. al*, 2011); **ITGBL1**, gen de la integrina β_3 , que es responsable de la adhesión de los OST a la matriz ósea (Zou, W. y Teitelbaum, S. L., 2010), y un alelo mutante del gen **MITF**, llamado **Mi** codifica una proteína que es crítica para la unión a genes blanco; se ha demostrado que ratones que carecen de Mi, son incapaces de formar células multinucleares, carecen de borde rugoso, expresan bajos niveles de TRAP y Catepsina K, y no reabsorben hueso eficientemente (Manski *et. al*, 2002) (Figura 1.4)

Otra molécula importante involucrada en la osteoclastogénesis es la osteoprotegerina (**OPG**), la cual es producida por los osteoblastos, y se une al ligando del receptor activador del factor $\text{N}\kappa\text{-}\beta$ (**RANKL**) evitando que éste se una al receptor activador del factor $\text{N}\kappa\text{-}\beta$ (**RANK**), inhibiendo la fusión de los precursores constituyendo una ruta de regulación negativa de la osteoclastogénesis (Boyle *et. al*, 2003; Lacey *et. al*, 1998).

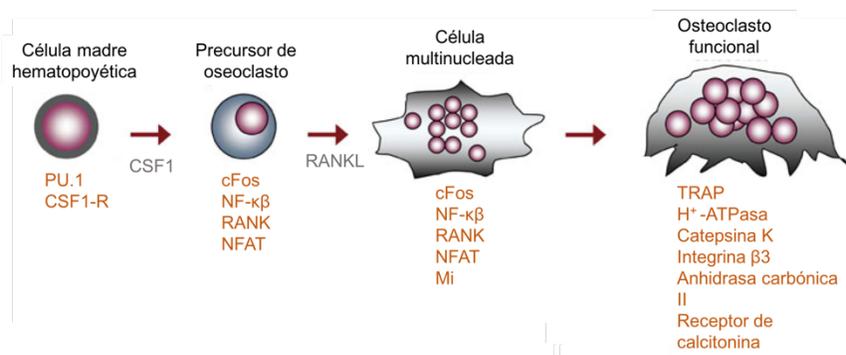


Figura 1.4. Moléculas importantes involucradas en la diferenciación de OST. Las moléculas señal se encuentran en gris, y los genes que expresa la célula en cada estadio en naranja. Modificada de: (Lee, 2010)

1.6 CSF1 y RANKL

1.6.1 CSF1

El factor estimulador de colonias de macrófago **CSF1** o **CSFM** (*colony stimulating factor-1* o *macrophage colony stimulating factor*), se expresa en un amplio rango de tipos celulares; y en particular, regula la diferenciación, la sobrevivencia y la función de células mononucleares fagocíticas, como son los monocitos, macrófagos, células dendríticas, células de Langerhans, microglia, y osteoclastos (Nakamichi *et. al*, 2013). Dentro de la gran variedad de procesos en los que **CSF1** está implicado; se ha descrito en líneas celulares cancerosas (Lin y Pollard, 2004), en procesos de inflamación y autoinmunidad (Szekanecz y Koch, 2007; Menke *et. al*, 2009), en obesidad y resistencia a insulina (Xu *et. al*, 2003), y arterioesclerosis (Moore y Tabas, 2011). De hecho, su pleiotropicidad se atribuye a que CSF1R posee gran afinidad a otros ligandos como IL-34 (Interleukina 34), además de ser homólogo a la oncoproteína v-fms (Mouchemore y Pixley, 2012).

CSF1R es una glicoproteína homodimérica (Hamilton, 1997) codificada por el proto-oncogen *c-fms* (Sherr *et. al*, 1985) que contiene 5 dominios similares a inmunoglobulinas descrita como un factor de crecimiento hematopoyético que regula funciones de monocitos y macrófagos mediante la activación del receptor de tirosina kinasa III **RTK** (*receptor tyrosine kinase*) llamado **CSF1R** (Stanley *et. al*, 1978), la activación de **CSF1R** mediado por CSF1 consiste en la dimerización del receptor y la transfosforilación de los residuos de tirosina del dominio kinasa intracelular, lo que resulta en la desencadenamiento de rutas de señalización (Hamilton, 1997).

Para comprender a mayor profundidad los procesos celulares en los que cualquier molécula participa, usualmente se procede a evitar su mecanismo de acción, o en algunos casos, *knockear* la expresión del gen que codifica para la molécula en cuestión. Para estudiar las distintas funciones de **CSF1** y **CSF1R**, habitualmente se emplea la mutación *osteopetrótica* (*op*) del ratón (Marks y Lane, 1976). Los ratones homocigóticos para la mutación *op* no poseen **CSF1** detectable debido a la mutación en el gen **CSF1**, que conforme el ratón envejece se recupera de la osteopetrosis, probablemente gracias a la acción del factor de crecimiento vascular endotelial (**VEGF**) (Niida *et. al*, 1999).

En un estudio realizado por Dai en 2002, se empleó la inactivación dirigida del gen **CSF1R** para determinar si es que **CSF1** activa otro receptor aparte de **CSF1R**, y por el contrario; si **CSF1R** es activado por algún otro ligando aparte de **CSF1**. Para ello, analizaron los fenotipos de diferentes cruces y se describió que el fenotipo obtenido en la mutación **CSF1R⁻/CSF1R⁻** es ligeramente más severo que **CSF1^{op}/CSF1^{op}**. Esto indica que los efectos de **CSF1** son mediados únicamente por **CSF1R**, y que los efectos más sutiles de **CSF1R** son el resultado de su activación mediada por otros ligandos, como IL-34.

Según estudios recientes sobre **CSF1** y **CSF1R**, se han encontrado formas de mejorar inmunoterapia mediante la inhibición de **CSF1**, que mejora la eficacia antitumor de la transferencia de células adoptivas, ya que **CSF1** recluta células mieloides infiltradoras de tumores (Mok *et. al*, 2014). Adicionalmente, se ha visto su participación en la señalización del dolor, debido a que se ha encontrado su expresión en neuronas de la raíz dorsal en respuesta a una herida, además de que en ratones *knock out* para **CSF1** la hipersensibilidad al dolor disminuye y se restaura cuando es inyectado en el canal espinal (Prabakaran, 2016).

1.6.2 RANKL

El ligando del receptor activador del factor $N\kappa\beta$, o **RANKL** (*receptor activator of $N\kappa\beta$ ligand*) es una citoquina perteneciente a la familia **TNF** (*tumor necrosis factor*), y aunque su principal función se relaciona con osteoclastogénesis, se ha visto que regula rutas de desarrollo y tumorigenesis de glándulas mamarias, es producido por células T en respuesta a estímulos inflamatorios, entre otras funciones (Hanada *et. al*, 2011). Además, **RANK** y sus receptores **RANKL** y **OPG** están evolutivamente conservados en mamíferos y aves (Sutton *et. al*, 2015).

RANKL ha tenido varias denominaciones desde que se descubrió en 1997 (Wong *et. al*, 1997), siendo **TRANCE** (*TNF-related activation-induced cytokine*) la primera de las nomenclaturas asignadas para **RANKL**, que fue clonado en hibridomas de células T murinas (Wong *et. al*, 1997). Después ese mismo año, un nuevo miembro de la familia de receptores TNF llamado **RANKL** fue clonado de una librería de cDNA de células dendríticas humanas, mientras que el homólogo murino fue aislado de una librería de cDNA de hígado fetal (Anderson *et. al*, 1997). Lacey *et. al*, descubrió en 1998 que **OPG** (antes llamado **OCIF**, por *osteoclastogenesis inhibitory factor*) se unía a una molécula que llamó **OPGL** (*osteoprotegerin ligand*), mismo que al descubrirse que consistía en un ligando de una proteína transmembranal tipo II de la familia de TNF, y que además satisfacía los criterios de factor de diferenciación de los osteoclastos, fue renombrada **ODF**. Yasuda *et. al*, (1998), determinó que **ODF** (*osteoclast differentiation factor*) es idéntico a **TRANCE** y a **RANKL**, que fue clonado de una librería de cDNA de células EL40.5 de timoma murino.

La primera de las cascadas de señalización mediadas por **RANKL** (en ese entonces denominado **TRANCE**) se determinó en 1997 por Wong y colaboradores, quienes encontraron que una forma recombinante de TRANCE, induce activación en células T mediante **JNK** (*c-Jun N-terminal kinase*) (Wong *et. al*, 1997). Desde entonces, al menos cuatro distintas cascadas mediadas por RANK y su receptor, entre ellas **IKK** (*inhibitor of $NF-\kappa\beta$*), p38, **ERK** (*extracellular signal-regulated kinase*), y las rutas de **Src**; las cuales están directamente relacionadas con los procesos de osteoclastogénesis y de activación (Boyle *et. al*, 2003).

La activación de **RANKL** consiste en que **RANK** trimeriza, lo que a su vez recluta a varios tipos de **TRAFs** (*TNF receptor-associated factors*), en particular **TRAF6**, el cual al interactuar con **c-Src** estimulan el eje **PI-3K** (*fosfatidilinositol 3 kinasa*)/**Akt** (*protein kinase B*), el cual regula mecanismos de apoptosis, y modificaciones en la estructura del citoesqueleto del OST, esencial para movilidad celular. Otros reguladores importantes involucrados en el proceso de osteoclastogénesis son **c-Fos**, **Fra-1**, y **NFATc1** (*nuclear factor of activated T cells 1*) (Figura 1.5) (Teitelbaum *et. al*, 2003).

En particular, **DC-STAMP** (*dendritic cell-specific transmembrane protein*), y **Atp6v0d2** (*d2 isoform of ATPase V0*); activan la fusión de precursores (Yagi *et. al*, 2005, Lee *et. al*, 2006), dichas moléculas son inducidas por **RANKL** mediante **NFATc1**, el cual se une directamente a las regiones promotoras de ambos **Atp6v0d2** y **DC-STAMP**, induciendo su expresión (Kabsun *et. al*, 2008). Los ratones *knockout* para **DC-STAMP** presentan osteopetrosis moderada, distinguida por la presencia de numerosas células mononucleares positivas para **TRAP**, que aunque reabsorben hueso, lo hacen de manera ineficiente, de igual forma los precursores de médula ósea **DC-STAMP**^{-/-} no pueden fusionarse al estimularse con **CSF1** y **RANKL**. Para comprender más el proceso de fusión entre los precursores monocíticos, se expresó GFP en células **DC-STAMP**^{-/-}, las cuales al cocultivarse con células **DC-STAMP**^{+/+}, se formaron células multinucleadas que incorporaban células **DC-STAMP**^{-/-} GFP (Yagi *et. al*, 2005). Esto indica que **DC-STAMP** se requiere en la célula precursora “primaria” que iniciará la fusión, pero no en aquellas células que esta célula está incorporando. Además, es evidencia de que **DC-STAMP** no es su propio ligando.

En 2008, se encontró una proteína que guardaba mucha similitud con **DC-STAMP**, la cual al ser aislada de OST, se le denominó **OC-STAMP**. Los resultados de ese estudio aseveran que la estructura secundaria de ambas es muy similar, que ambas son fuertemente inducidas por **RANKL**, y que cuando ambas se inhiben no ocurre fusión, pero procesos posteriores, como la expresión de **TRAP** se mantienen (Yang, *et. al*, 2008). Sin embargo, **OC-STAMP** no compensa la falta de **DC-STAMP**, siendo que los ratones **DC-STAMP**^{-/-}, sólo presentan osteoclastos mononucleares (Yang, *et. al*, 2008).

En la actualidad, se ha estudiado el papel que tiene **RANKL** sobre la artritis reumatoide (Boman *et. al*, 2017), la diabetes mellitus (Kiechl *et. al*, 2013), cáncer de mama (Sigl y Penninger, 2014), el efecto de algunos compuestos como el ácido cafeico en el metabolismo del hueso (Tolba *et. al*, 2017), e incluso se han investigado formas de liberación como tratamiento innovador para enfermedades como la osteopetrosis (Cappariello *et. al*, 2015).

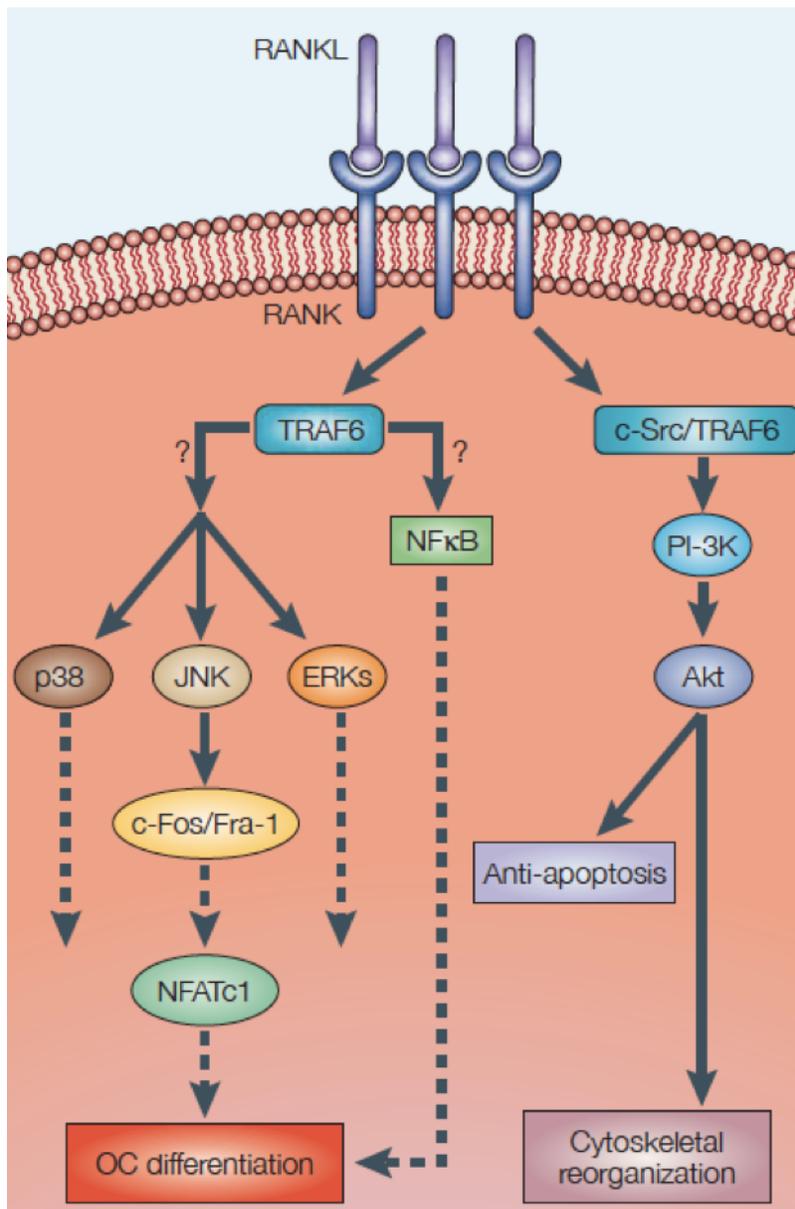


Figura 1.5. Reguladores importantes involucrados en la ruta activada por RANKL. (Teitelbaum, 2003).

1.7 Enfermedades del tejido óseo

La más común de las enfermedades en donde ocurre un desbalance en la población de osteoblastos y OST, es la osteoporosis. La osteoporosis consiste en la disminución de matriz ósea, consecuencia del aumento en la población de OST, lo que en su mayoría es causado por la pérdida de hormonas que regulan la osteoclastogénesis (Michael *et. al*, 2005), esto provoca un aumento en la porosidad del tejido, lo que a su vez incrementa el riesgo de fractura (Hadji *et. al*, 2013). La medición de la densidad ósea es fundamental para el diagnóstico, tratamiento y pronóstico de la osteoporosis (Cummings *et. al*, 2002). El hueso osteoporótico se diferencia del normal por la cantidad y tamaño de los poros que presenta el tejido, lo que al alterar la microarquitectura del hueso, y a su vez la fuerza mecánica del hueso; incrementa el riesgo de fracturas. (Dalle Carbonare y Giannini, 2004) (Figura 1.6).

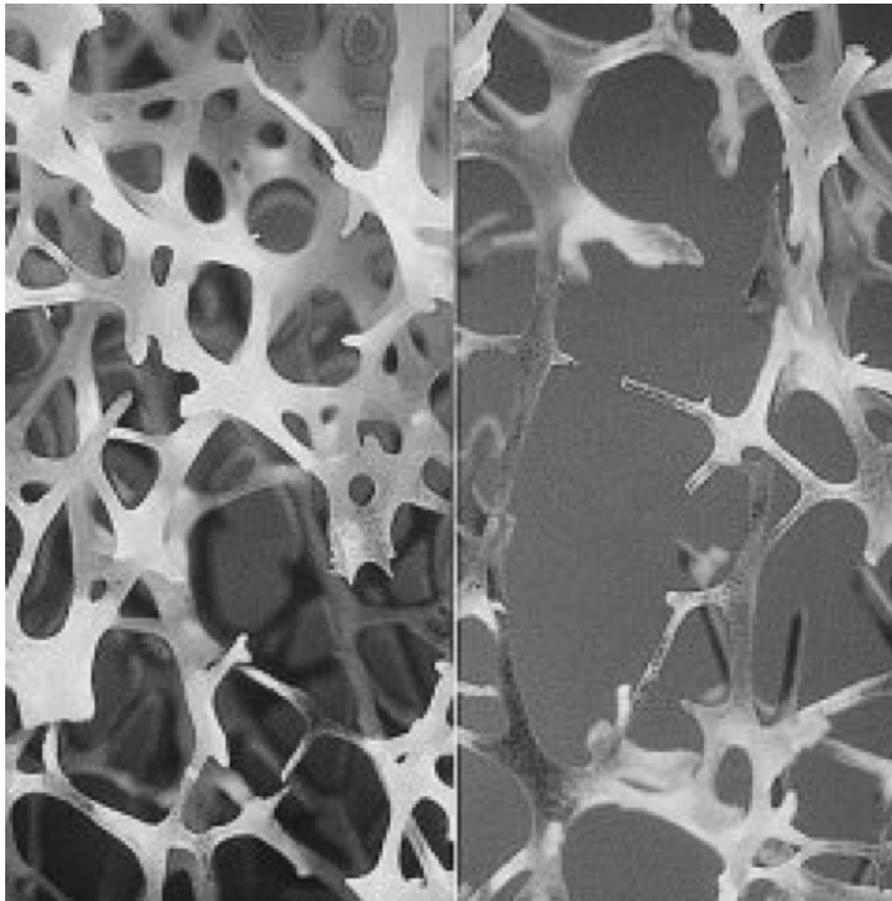


Figura 1.6. Hueso sano (izquierda) y hueso osteoporótico (derecha). El hueso sano presenta poros característicos del tejido, los cuales son determinantes estructurales de la fuerza mecánica del hueso (Dalle Carbonare y Giannini, 2004), el hueso osteoporótico, se caracteriza por baja mineralización del tejido, presenta poros muy grandes en comparación con el hueso sano. (OIF, s.f.)

Según un estudio realizado por la Fundación Internacional de Osteoporosis, 1 de cada 12 mujeres sufrirá una fractura de cadera relacionada con la osteoporosis, y se espera que el número de fracturas de caderas pasará de 1.2 millones (en la década de los '90) a 2.6 millones para el 2025 y a 4.5 millones en el 2050; asimismo, a nivel nacional el costo total directo de las fracturas de cadera en México superó los 97 millones de dólares (IOF, 2012; Lovato-Salas *et. al*, 2015). Esta enfermedad es sumamente detrimental para quienes la padecen, ya que además del riesgo incrementado de sufrir fracturas, y las complicaciones inherentes a fracturas ya existentes como dolor debido a cambios en la

postura, las personas suelen limitar su movimiento y así la variedad de las actividades que realizan (Makridis *et. al*, 2015; Pisani *et. al*, 2016).

Por otro lado, la osteopetrosis es una enfermedad genética caracterizada por la acumulación de matriz ósea causada por fallas en la reabsorción de hueso, lo que ocasiona defectos en el crecimiento, inmunosupresión, y riesgo de fracturas (Stark y Savarirayan 2009). Existe de forma autosómica dominante la cual empieza en la adultez y se considera benigna (Del Fattore *et. al*, 2008); o autosómica recesiva, donde el defecto recae principalmente en los OST, en este caso la enfermedad puede tratarse con trasplante de precursores hematopoyéticos, excepto cuando está ligada al gen TNFSF11 siendo que el defecto consiste en RANKL biológicamente inactivo (Frattini *et. al*, 2000).

Otras enfermedades en donde ocurre un desbalance entre la absorción y fijación de hueso, son enfermedad de Paget, osteolisis tumoral, periodontitis, varios tipos de artritis (Lee, 2010), (Sobacchi *et. al*, 2013), las cuales no sólo se presentan en humanos sino también en ratones (Rinotas *et. al*, 2014), ratas (Du *et. al*, 2010), perros (Krook *et. al*, 1917; Park *et. al*, 2014), ovejas (Turner, 2002), caballos (Hovagimian *et. al*, 2011), vacas (Yu *et. al*, 2011; Dittmer *et. al*, 2016), palomas domésticas (Wimsatt *et. al*, 2000), y pollos (Huang y Li, 2013).

A pesar del detrimento que estas enfermedades suponen para la calidad de vida, particularmente la osteoporosis; los estudios hechos en OST hasta ahora, sólo se han llevado a cabo mediante la obtención de OST primarios de varias especies cultivados sobre cortes de hueso o diferentes medios de cultivo (Chambers *et. al*, 1984; David *et. al*, 1998; Piper y Boyde 1992; Tetti *et. al*, 1999) en co-cultivo con células estromales (Heinemann *et. al*, 2011); Ferron *et. al*, 2010; Takahashi *et. al*, 1988 b), y años después adicionando CSF1 y RANKL únicamente a precursores de sangre periférica de humano (Michael *et. al*, 2005), y a precursores en médula ósea de ratón (Schulze *et. al*, 2011); sin considerar las ventajas intrínsecas de efectuar la diferenciación *in vitro* en otros modelos de estudio ni las desventajas de las técnicas existentes.

1.8 El modelo del pollo en estudio de osteoclastogénesis

Teniendo al pollo como organismo modelo, este trabajo tiene un impacto adicional en la industria avícola y en estudios de bienestar animal, en donde un problema común es el síndrome de fatiga de jaula. Se ha demostrado que las gallinas ponedoras normales, y aquellas suministradas con estrógeno que sufren de fatiga de jaula; padecen además osteoporosis y fragilidad ósea (Fasanmi *et. al*, 2014) a diferencia de los pollos criados para producción de carne (Bennet *et. al*, 2006). Esto tiene implicaciones en la producción de huevo porque las gallinas con fracturas óseas recientes son más susceptibles al estrés, haciendo más probable una muerte prematura o una disminución en el tiempo de vida productiva (Webster, 2004).

Hasta ahora, los estudios sobre OST de pollo no involucran diferenciación *in vitro* de precursores de médula ósea o de sangre periférica, sin embargo sí se extraen OST primarios del hueso, e incluso se han publicado algunos protocolos para ese propósito (Álvarez *et. al*, 1991; Collin-Osdoby y Osdoby 2012). La extracción de OST se ha empleado para evaluar su capacidad reabsortiva sobre ciertos sustratos (Kim *et. al*, 2001); su capacidad acidificante (Yang *et. al*, 2012), las interacciones entre las proteínas de la matriz ósea (Amend *et. al*), o algunas moléculas que participan en su diferenciación (Brazier *et. al*, 2006; Sharma *et. al*, 2007; Kim *et. al*, 2005; Matsuo *et. al*, 2000) entre otros. Además, los protocolos publicados hasta ahora son costosos, complejos, e ineficientes (Basle *et. al*, 1988; Osdoby, 2012; Marino *et. al*, 2014).

El pollo como modelo de estudio ofrece muchas bondades: la respuesta inmune es más similar que la del ratón a la respuesta inmune humana (García-Morales, Por publicar), posee vías de señalización de líneas mieloides conservadas (Kieslinger, 2000), y es el organismo modelo por excelencia de angiogénesis y osteogénesis (Stern, 2005). Aunado a lo anterior, es el único organismo modelo con valor económico: En 2016, México ocupó el primer lugar en consumo de huevo entero, con 22 kilogramos por persona al año, el sexto de los diez principales países productores de huevo y el séptimo de los diez países productores de carne (UNA, 2016).

1.9 Estudios de expresión génica a gran escala

Para los estudios donde se monitorean los niveles de expresión de miles de genes simultáneamente, usualmente se emplea la tecnología de los microarreglos. Un microarreglo es una laminilla de vidrio o “chip” con varios miles de puntos, donde en cada uno se disponen ordenadamente miles de copias de fragmentos de DNA cuya identidad se conoce (sonda) (Figura 1.7), los cuales se colocan ahí mediante un robot, o mediante fotolitografía. Los microarreglos permiten analizar las grandes cantidades de datos provenientes de los niveles de expresión de los miles de genes que componen el chip. Típicamente, se emplean para comparar los niveles de expresión entre dos muestras provenientes de diferentes condiciones, como silvestre vs mutante, o sano vs enfermo. (Grant, 2004).

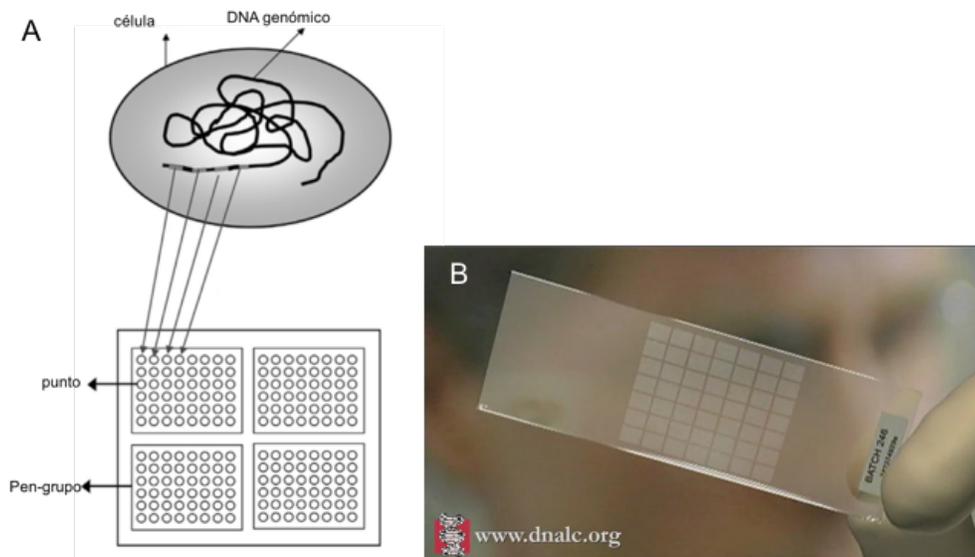


Figura 1.7. Esquema de un microarreglo. A. Cada punto contiene una secuencia de oligonucleótido o DNA genómico que representa un gen, éstos se encuentran subdivididos en “pengrupos”. Modificada de: Grant, 2004. B. Chip de microarreglo, gradilla compuesta de alrededor de 30,000 puntos con fragmentos de DNA. Tomada de: DNALC Blogs, s.f.

La tecnología se basa en que el mRNA actúa como un marcador putativo de la expresión de un gen en particular, pero considerando que el RNA se degrada fácilmente, es necesario generar cDNA a partir de él, posteriormente este es marcado con fluorocromos Cy3 (verde) y Cy5 (rojo). Sobre el chip se coloca la muestra de cDNA para que hibridice por complementariedad a los fragmentos del microarreglo; la cantidad de cDNA que hibridice con las sondas presentes en el chip, será directamente proporcional a la cantidad de mRNA que la muestra contenía originalmente de cada gen en particular. Mediante excitación por láser, las diferentes hibridizaciones emitirán señales gracias a los colorantes verde y rojo; estas señales son detectadas y medidas por computadora para determinar de manera global los niveles de expresión que tiene la muestra de todos los genes (fragmentos de DNA) que componen el chip (Govindarajan, *et. al.*; 2012). Por ejemplo, si una sonda en el chip tiene un color rojo o verde, significa que una de las

dos condiciones expresa más ese gen que la otra, si el punto es amarillo, dicho gen se expresa de la misma forma en ambas condiciones; y en el último caso, si el punto es negro, dicho gen no se expresa en ninguna de las dos muestras. Debido a que cada punto será representado por un color, y existen miles de puntos dentro del chip, el análisis de la imagen requiere un proceso muy detallado. Como primer paso, deben identificarse los puntos del chip especificando al software de análisis de imagen dónde se encuentran los penguos. Como segundo paso deben determinarse el área del punto que va a analizarse individualmente, y finalmente generar datos estadísticos extraídos de cada punto. Usualmente las compañías que realizan microarreglos como Affymetrix, Agilent Technologies, o BD Biosciences, hacen parte de su servicio el análisis de la imagen generada por el chip, posteriormente devuelven los datos en crudo; haciendo tarea del investigador el análisis de la información contenida en ellos.

Un primer acercamiento a los datos en crudo, es la obtención de los radios de expresión, que se definen como $T_k=R_k/G_k$, donde k es un gen, R es la intensidad medida de la muestra proveniente de una condición y G la intensidad de la muestra proveniente de la otra condición (Grant, 2004). Debido a esto, un valor de $T_k>1$ significará que la muestra de la condición R expresa más el gen en cuestión que la condición G , $T_k=1$ significará que ambas muestras expresan en la misma cantidad el gen en cuestión, y $T_k<1$ querrá decir que la muestra de la condición G , expresa más el gen en cuestión que la condición R . Este valor numérico es ventajoso para separar los genes más expresados en una condición u otra. Una manera útil de visualizar globalmente los resultados de un microarreglo es mediante la agrupación o “*clustering*” de genes cuyo patrón de expresión es similar, gracias a esto puede hipotetizarse que los genes que pertenecen a un mismo grupo están relacionados entre sí porque participan en un mismo proceso celular, o porque se expresan al mismo tiempo (Merico *et. al*, 2009).

Dependiendo de lo que se requiera determinar en cada experimento, pueden hacerse muchos más análisis estadísticos que permitan obtener otra clase de información, para ello se han desarrollado muchos softwares de análisis para datos de microarreglo, como ErmineJ (Lee *et. al*, 2005), GenMAPP (Dallhquist *et. al*, 2002), Expression Console (Lovén, *et. al*, 2012; Sanges *et. al*, 2007), BioLayout (Theocharidis *et. al*, 2009) y muchos otros (Huang *et. al*, 2009; Pavlopoulos *et. al*, 2008).

El diseño de los chips considera que típicamente los genomas consisten en varios miles de genes, de modo que los que se encuentren en un chip deben representar la expresión diferencial entre dos muestras de manera precisa (Mukherjee y Roberts *et. al*, 2004; Yang *et. al*, 2006). Cuando se aseveró en párrafos anteriores que se conoce la identidad de las copias del fragmento de DNA ubicado en cada punto en el chip, no necesariamente se refiere a que se conoce el nombre del gen en particular que pertenece dicho fragmento, sino que dicha secuencia pertenece a un gen aunque su nombre o función se desconozca; como el caso de los marcos de lectura abierto (ORF), los cuales son secuencias que preceden a un codón de inicio; es decir forman parte de DNA codificante (Lewin *et. al*, 1994).

Por lo anterior, a menudo el análisis de los datos de expresión provenientes de un microarreglo se apoya en la anotación funcional de genes, que consiste en la atribución de una función biológica a una secuencia de nucleótidos (Stein, 2001), o bien la nominación de un gen a una secuencia; sin embargo, dicho concepto es extensivo a la anotación de una proteína o de un proceso metabólico. La información que puede extraerse del genoma de un organismo es proporcional a qué tan anotado se encuentre su genoma; por ejemplo, los genomas del humano y el ratón se encuentran anotados casi en su totalidad, mientras que en los genomas de organismos más recientemente secuenciados no es el mismo caso.

A pesar de que el genoma del pollo está completamente secuenciado (Hillier *et. al*, 2004), su anotación aún es deficiente comparados con los genomas del humano o del ratón, lo que supone simultáneamente una limitación y una oportunidad en el uso de este organismo como modelo en estudios con microarreglos.

2. Justificación

Los estudios sobre la diferenciación de los OST tienen impacto en la medicina moderna porque permiten identificar genes clave en la diferenciación o función de dicho tipo celular, que podrían ser propuestos como blancos terapéuticos contra enfermedades óseas donde se requiera controlar la población de OST.

Aunque existen blancos terapéuticos contra la osteoporosis y la osteopetrosis (Lories, 2001), es importante contar con varios de estos blancos para adecuar el tratamiento a cada organismo. En este trabajo se pretende diferenciar OST de pollo *in vitro* e identificar los genes expresados específicamente en dichas células, y considerando que conserva vías genéticas con otros organismos, incluyendo el humano, servirá como modelo para los procesos de remodelación de hueso.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Diferenciar OST de pollo *in vitro* mediante el cultivo con CSF1 y RANKL.

3.2 Objetivos particulares

- Optimizar las condiciones de cultivo celular para diferenciar células multinucleadas exponiendo precursores de médula ósea de pollo a diferentes concentraciones de CSF1 y RANKL.
- Identificar los genes más expresados en células multinucleadas
- Realizar la anotación funcional de genes más expresados en OST.

4. Hipótesis

Exponer precursores de médula ósea a citoquinas específicas de ave generará OST funcionales *in vitro* caracterizados por la expresión de genes conservados en otras especies y de genes propios de la especie.

5. Materiales y métodos

5.1 Cultivo de células

5.1.1 Obtención y proliferación de células precursoras monocíticas

Se utilizaron pollitas ponedoras de 2 semanas de edad. Se sacrificaron mediante dislocación cervical (ASP, 2012). Antes de disectar los fémures y las tibias, se embebieron las plumas en etanol 70%, se retiró la piel y se cortó a través del hueso teniendo cuidado de no romper las epífisis de los huesos. Una vez limpios los huesos de la mayor cantidad de músculo y tejido conjuntivo posible, se colocaron en solución balanceada de fosfatos (PBS) (Sigma, Cat NO. P4417) atemperado a 37 °C. A partir de este punto se trabajó en la campana de flujo laminar clase II (Nuair UN-425-300). Una vez dentro de la campana, se hizo una última limpieza a los huesos, sumergiéndolos en etanol al 70% para

deshidratar el tejido que haya quedado adherido, y luego transfiriéndolos a PBS o medio RPMI-1640 (Sigma, Cat NO. R0883) para lavar el etanol y evitar que las células se fijen.

Para extraer la médula ósea (MO), se cortaron las epífisis y empleando una jeringa se hizo pasar rápidamente PBS a través de la cavidad medular para obtener las células precursoras monocíticas (CPM) de macrófagos (MAC) y OST, después de este procedimiento, el hueso debe verse de un color más claro, señal de que se encuentra vacío. La MO recuperada se pipeteó varias veces acercando la punta de la pipeta serológica al fondo del tubo para disgregar las células y obtener una solución de células individuales. Dicha solución se hizo pasar por un tamiz celular con poros de 70 μm , y se colocó en un tubo Falcon de 50 ml nuevo. Se contaron las células en la cámara de Neubauer, empleando azul tripán en una relación 1:1. Si era necesario congelar, se colocaban alrededor de 6×10^6 células por mililitro en FCS (fetal calf serum, ATCC, Cat NO. 302031) con 10% de DMSO (Sigma, Cat. NO C6295), en crioviales de 2 ml, y se congelaban a -70°C (Ultracongelador Thermo Scientific 904).

Se centrifugaron las células a 1200 rpm por 5 minutos a 4°C (Ultracentrífuga Eppendorf 5804R), y cuidadosamente se decantó al sobrenadante. Gentilmente se resuspendieron las células en medio completo, compuesto por medio RPMI-1640 (Sigma, Cat NO. R0883), 10% FCS (ATCC, Cat NO. 302031), 2mM de L-glutamina (Sigma, Cat NO. 59202C) y 10 mL/L de Penicilina Estreptomicina (Sigma, Cat NO. P0781).

Para obtener diferencialmente las CPM, la MO completa se cultivó en tres placas de cultivo de 100 mm con 1.31×10^6 células en cada una, en 10 mL de medio completo enriquecido con sobrenadante de células HEK transfectadas con CSF1 a 37°C , con 5% de CO_2 (Incubadora Shelab 2406).

5.1.2 Optimización de condiciones de cultivo para obtención de células multinucleadas

El RANKL y el CSF1 empleado para la diferenciación fue provisto por el Instituto Roslin (Edimburgo, RU), quienes llevaron a cabo la clonación de CSF1 en células HEK293T, transfectadas con el plásmido pEF6-cCSF1 usando Lipofectamina 2000, después de 48 horas se colectó el sobrenadante (ex-HEK-cCSF1) y se lisaron las células con una solución 2% de SDS, y 10mM buffer Tris (Garceau, *et. al*, 2015). RANKL fue clonado por los colaboradores del Instituto Roslin en células COS-7 transfectadas con el plásmido pCI-IZFLAG-schRANKL, empleando DEAE-dextrán, 72 horas después, recuperaron los sobrenadantes (ex-COS-7 RANKL) , se filtraron y fueron almacenados a 4°C hasta su uso (Sutton *et. al*, 2015).

Seguido del periodo de incubación en CSF1 para producir CPM, se llevó a cabo la optimización de condiciones para producir MAC y OST. Los MAC se emplearon como grupo control debido a que comparte progenitor hematopoyético con los OST (Boyle *et. al*, 2003), de este modo permitirá comparar el tamaño celular y el número de núcleos en su interior. Se retiró el medio y la superficie de las placas se lavó con PBS atemperado a 37°C dos veces para retirar las células no adheridas a la superficie. Empleando una jeringa con PBS atemperado, se despegaron las células haciendo pasar el chorro de PBS por toda la superficie de la caja bacteriológica, repitiendo el proceso varias veces, hasta observar a contra luz que la superficie de la placa esté limpia. Se contaron las células en la cámara de Neubauer, empleando azul tripán en una relación 1:1, y posteriormente se centrifugaron las células a 1200 rpm por 5 minutos a 4°C , y cuidadosamente se decantó al sobrenadante.

En una placa tratada para cultivo de células de 96 pozos, se cultivaron 2×10^5 CPM en cada uno con medio completo suplementado con distintas concentraciones y combinaciones de sobrenadantes con CSF1 y RANKL (Figura 5.1), bajo las mismas condiciones de incubación, observándolas diariamente.

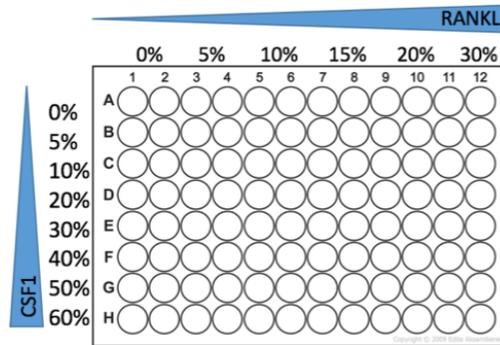


Figura 5.1. Plato de valoración. Se probaron distintas concentraciones de CSF1 y RANKL combinados en los pozos.

5.1.3 Microscopía y tinción de GIEMSA y fluorescente

Una vez determinadas las condiciones óptimas para generar OST y MAC, se repitió la diferenciación en dos cajas de 60 mm donde fueron situados dos cubreobjetos, a los que se les colocó el suficiente FCS para cubrir por completo la superficie del cubreobjeto y se dejó secar por unos minutos dentro de la campana de flujo laminar. Después, se sembraron 5×10^5 CPM en cada caja, una con medio adicionado con RANKL para generar OST, y otra con medio adicionado con CSF1, para generar MAC. Los cubreobjetos de cada caja fueron teñidos con GIEMSA y HOECHST/faloidina, obteniendo MAC y OST teñidos con ambas tinciones.

Para la tinción con GIEMSA (Sigma, Cat No. 5637), se fijaron los cubreobjetos en metanol por 6 minutos y se dejaron secar, después se colocó la cantidad suficiente de GIEMSA (1:20) para cubrir la totalidad del cubreobjetos, incubando a temperatura ambiente por una hora, se enjuagó con agua desionizada, se dejó secar y se montó en un portaobjetos usando Quick Hardening Mounting Medium (Sigma, Cat NO. 03989).

La tinción fluorescente con HOECHST (Sigma, Cat No. H6024) para cromatina, y faloidina (Thermo Scientific, Cat No. T7471) para membranas se llevó a cabo fijando los cubreobjetos previamente lavados con PBS atemperado, en formol al 4% por 10 minutos, después de lavar, se incubó en solución Triton X-100 al 0.1% en PBS por 4 minutos y se lavó dos veces con PBS. Se pre-incubaron los cubreobjetos en una solución de caseína al 1% en PBS durante 30 minutos. Después de lavar los cubreobjetos con PBS, se colocó justo lo necesario de solución de faloidina (5 μ L de faloidina en 200 μ L de PBS) durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Después se colocó en la solución de tinción de HOECHST (1:1000) y se incubó por 5 minutos en la oscuridad. Se dejó secar, y se montó en un portaobjetos usando Quick Hardening Mounting Medium (Sigma, Cat NO. 03989). Para almacenar a largo plazo, los portaobjetos se colocaron a 4 C y cubiertos de la luz. Las muestras fueron observadas empleando un Microscopio Confocal de barrido láser (CLSM), modelo TCS SPE / CTR 4000, marca LEICA.

Para visualizar si existen diferencias entre el número de núcleos por célula en los cultivos de MAC y de células multinucleadas se generó un gráfico de caja y bigotes en el software libre R 3.3.0 GUI, con el siguiente código:

```
##### INICIO GRÁFICO DE CAJA Y BIGOTES #####

# Leer datos
MN<-read.table(file="/Users/RGIII/Documents/OST/Drafts/Tesis/tablas/MNuc.txt",header=TRUE,fill=TRUE)

# Dibujar gráfico de caja y bigotes
boxplot(MN)
```

```
##### FIN GRÁFICO DE CAJA Y BIGOTES #####
```

5.2 Microarreglo

Se extrajo mRNA de cultivos por triplicado de OST y MAC utilizando el kit de extracción RNeasy Mini Kit® (QIAGEN Cat NO. 74104), bajo las instrucciones del proveedor. Se analizó la calidad de las seis muestras de mRNA extraído utilizando pruebas de Agilent®. Se envió 1µg de mRNA de cada muestra a ARK Genomics (Instituto Roslin) para la realización del microarreglo usando el chip Affymetrix® ChiGene 1.0 st v1.0.

5.2.1 Análisis cualitativo del microarreglo de RNA

Para poder relacionar los números que identifican a cada sonda del microarreglo con un gen anotado o no anotado se le asocia a una librería asociada al organismo de cuyo genoma está diseñado el chip. Para realizar esta asociación se empleó el software de Affymetrix Expression Console, el cual también permite hacer una evaluación sobre la calidad de los datos del microarreglo. Se generó un gráfico de dispersión y un mapa de calor empleando el software libre R 3.3.0 GUI, con los siguientes códigos.

```
##### INICIO MAPA DE CALOR #####

# Instalar paquetes
library(gplots)
library(geneplotter)

# Leer archivo
datamat<-
  read.csv(file="/Users/RGIII/Documents/OST/R/databases/OSMAp
  rueba.csv")
rnames <- data mat[,1]
rownames(datamat) = make.names(rnames, unique=TRUE)
datamat<-datamat[,-1]
datamat<-data.matrix(datamat)

# Eliminar valores no numéricos
datamat[is.na(datamat)] <- 0

# Ordenar los datos
min<-apply(datamat,1,min)
max <- apply(datamat,1,max)
nr<-nrow(datamat)
sdatamat <- datamat[order(max - min,
  decreasing=TRUE),][1:nr,]

# Dibujar mapa de calor
heatmap.2(sdatamat,Colv=FALSE,cexRow=1,cexCol=1,dendrogram="
  row",scale="row",trace="none",density.info="none",key=FALSE
  ,col=greenred.colors(80))

##### FIN MAPA DE CALOR #####

##### INICIO GRÁFICO DE DISPERSIÓN #####

# Instalar paquetes
library(ggplot2)

# Leer archivo como marco de datos
om<-read.delim(file="/Users/RGIII/Documents/OST/Raw
  Data/no_reordering.txt",row.names=1,header=TRUE)
attach(om)

# Dibujar gráfico de dispersión
qplot(rCSF1,rRANKL,colour=om$Factor)+stat_smooth(meth
  od=lm,se=FALSE)

qplot(rCSF1,rRANKL,colour=c('red','gray','blue')om$Fa
  ctor)+stat_smooth(method=lm,se=FALSE)

##### FIN GRÁFICO DE DISPERSIÓN #####
```

Una vez obtenidos los datos del microarreglo a los cuales se les asoció el número de identificación de la sonda (Probe Set ID), se llevó a cabo un análisis cualitativo del microarreglo, que se realizó en el software BioLayout Express®, empleando un valor mínimo de correlación de 0.9.

5.2.2 Anotación funcional

Los datos del microarreglo se organizaron en una hoja de cálculo de Excell en función a los radios de expresión promedio entre ambos grupos para identificar genes específicos de OST y MAC. Se seleccionaron para ser anotadas aquellas sondas que tuvieran el radio más cercano a 0, señal de su expresión favorecida en OST, y se buscó su función en bases de datos. La primera búsqueda que se realizó fue en la base de datos del microarreglo a la cual se accedió desde el sitio NetAffx™ Analysis Center (Affymetrix, 2017), y de ser necesario se realizó una búsqueda adicional en bases de datos como Ensembl.org donde se hizo una búsqueda BLAST en el genoma del pollo, ratón, humano, y otros organismos.

6. Resultados y discusión

6.1 Cultivo de células

6.1.1 Obtención y proliferación de células precursoras monocíticas

Se observó que fueron necesarios tres días de incubación con 20% de sobrenadante con CSF1 (20% CSF1), o bien con 348ng/ml de CSF1 purificado para generar CPM. Pasado este periodo de incubación la morfología de las células de MO denota una mayor adhesión a la superficie, aumentado de tamaño, y la diferenciación comienza a ser evidente debido a la presencia de algunos macrófagos en el cultivo (Figura 6.1)

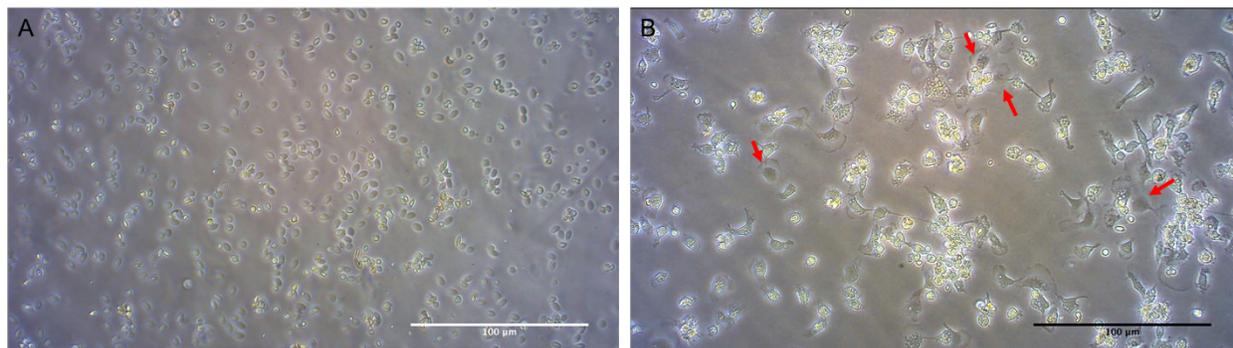


Figura 6.1 . Micrografía del cultivo inicial de MO en CSF1. A. Células de médula ósea después de dos horas de haber sido sembradas. Las células ya se encontraban pegadas a la superficie, con algunas células aún flotando. B. Células de médula ósea después de 72 horas. Las células se encuentran más pegadas a la superficie a juzgar por su tamaño, y hay presencia de macrófagos (algunos señalados con flechas rojas), hasta este punto se les denominó CPM. Objetivo: 20X

Las condiciones establecidas para la obtención de CPM tienen como objetivo que éstas proliferen y puedan sobrevivir el proceso de transferencia a otra placa de cultivo para ser diferenciadas. Adicionalmente, gracias a este proceso de proliferación inicial, es posible separar selectivamente las CPM del resto de los tipos celulares que se encuentran en la MO como los eritrocitos y otras células de carácter pluripotente que se podrán diferenciar en cartílago, adipocitos y otros linajes hematopoyéticos (Krebsbach *et. al*, 1999); las cuales usualmente mueren pasados los tres días de incubación con 20% CSF1.

Se observó que las CPM a diferencia de otras células presentes en la MO, se adhieren a la superficie de la placa de cultivo de grado bacteriológico como lo hicieran a una placa tratada para cultivo de células, sin embargo, al cultivar las CPM en una placa grado bacteriológico es posible despegarlas de dicha superficie sin que éstas mueran, a

diferencia de cuando son sembradas a una placa tratada para cultivo celular, ya que las CPM mueren al intentar despegarlas mediante el método descrito, y además se observó que se activan si se utiliza tripsina.

6.1.2 Optimización de condiciones de cultivo para obtención de células multinucleadas

En la Figura 6.2 se observa el proceso de diferenciación a distintos días del cultivo con RANKL o CSF1. Las células en cultivo con RANKL en el primer día son mononucleadas, con flechas rojas se señala la morfología similar a un “huevo frito” presentes en ambos cultivos (Figura 6.2A y B), dicha morfología se mantiene en ambos cultivos durante el primer y segundo día de la diferenciación (Figura 6.2C, D, F, y G, flechas rojas).

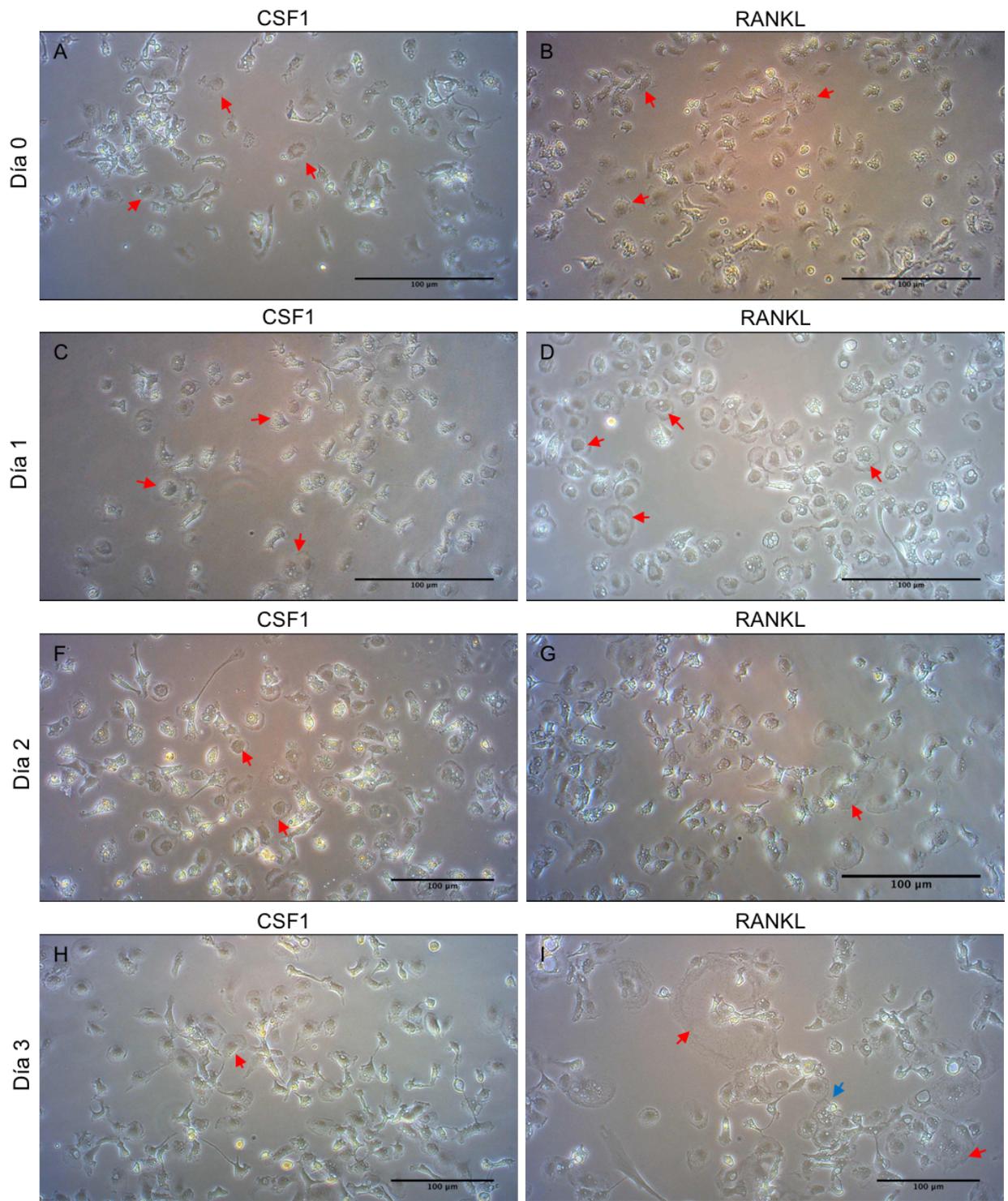
A partir del tercer día las células del cultivo enriquecido con RANKL 5% han aumentado de tamaño, y comienzan a apreciarse células multinucleadas (Figura 6.2I, flechas rojas), sin embargo su número no sobrepasa la población de células uninucleadas con forma de “huevo frito” (Figura 6.2I, flecha azul).

Durante el cuarto día, las células del cultivo enriquecido con 20% de CSF1 presentan una morfología muy similar al primer día de la diferenciación, con la diferencia de que algunas células han cambiado su morfología debido a que ha aumentado la confluencia (Figura 6.2J), se observó también que aunque con poca ocurrencia, algunas células del cultivo enriquecido con 20% de CSF1 se fusionaban (Figura 6.2J, flecha roja). Por otro lado, las células del cultivo enriquecido con 5% RANKL (Figura 6.2K), presentan una aglomeración señalada con una flecha roja, señal de que las células que ahí se encuentran están próximas a fusionarse.

En el séptimo día de la diferenciación, mientras que las células en medio enriquecido únicamente con 20% de CSF1 mantienen la morfología que presentaron el cuarto día de la diferenciación (Figura 6.2L), en el cultivo enriquecido con 5% de RANKL (Figura 6.2M) se aprecia un cultivo donde el número de células multinucleadas (señaladas con flechas rojas) sobrepasan a las células uninucleadas, además de que las células fusionadas cubren casi la totalidad de la superficie de cultivo, también se observan pequeñas células altamente autofluorescentes (Figura 6.2M, en color amarillo) encima de las células fusionadas, cuya morfología es similar a la de una CPM (Figura 6.1B), darán lugar a nuevas células uninucleadas capaces de fusionarse.

En el octavo día de la diferenciación, las células del cultivo con CSF1 vuelven a presentar señales de fusión entre células (Figura 6.2N, flecha roja) ya que se observan células más grandes en comparación con el tamaño que presentaban el día anterior, mientras que la morfología de las células cultivadas con RANKL presentan un ligero incremento de tamaño en las células multinucleadas el octavo día (Figura 6.2O, señalados con flechas rojas) comparadas con el séptimo día (Figura 6.2M).

En el noveno día, se observó que las células en el cultivo con 20% CSF1 comenzaban a cambiar su morfología conforme el cultivo se hacía más confluyente (Figura 6.2P, flechas rojas) las células presentan proyecciones de membrana, así como estructuras altamente auto-fluorescentes (Figura 6.2P, visibles en color amarillo), se ha reportado que los receptores de contacto celular en MAC constituyen una forma de activación de dichas células (Xia *et. al*, 2009), por lo que el cambio de morfología de los MAC al encontrarse en un cultivo confluyente puede deberse a que éstos se activan. También, en el cultivo enriquecido con 5% RANKL, se aprecia un cultivo de células multinucleadas que cubren casi la totalidad de la superficie del cultivo, donde además el tamaño de las células aumentó con respecto al día anterior. En las cinco veces que se repitió la diferenciación, se llegaron a encontrar células multinucleadas de hasta 315 μm de diámetro durante el noveno día de la diferenciación, lo cual no se observó en los cultivos con 20% de CSF1 (Figura 6.3).



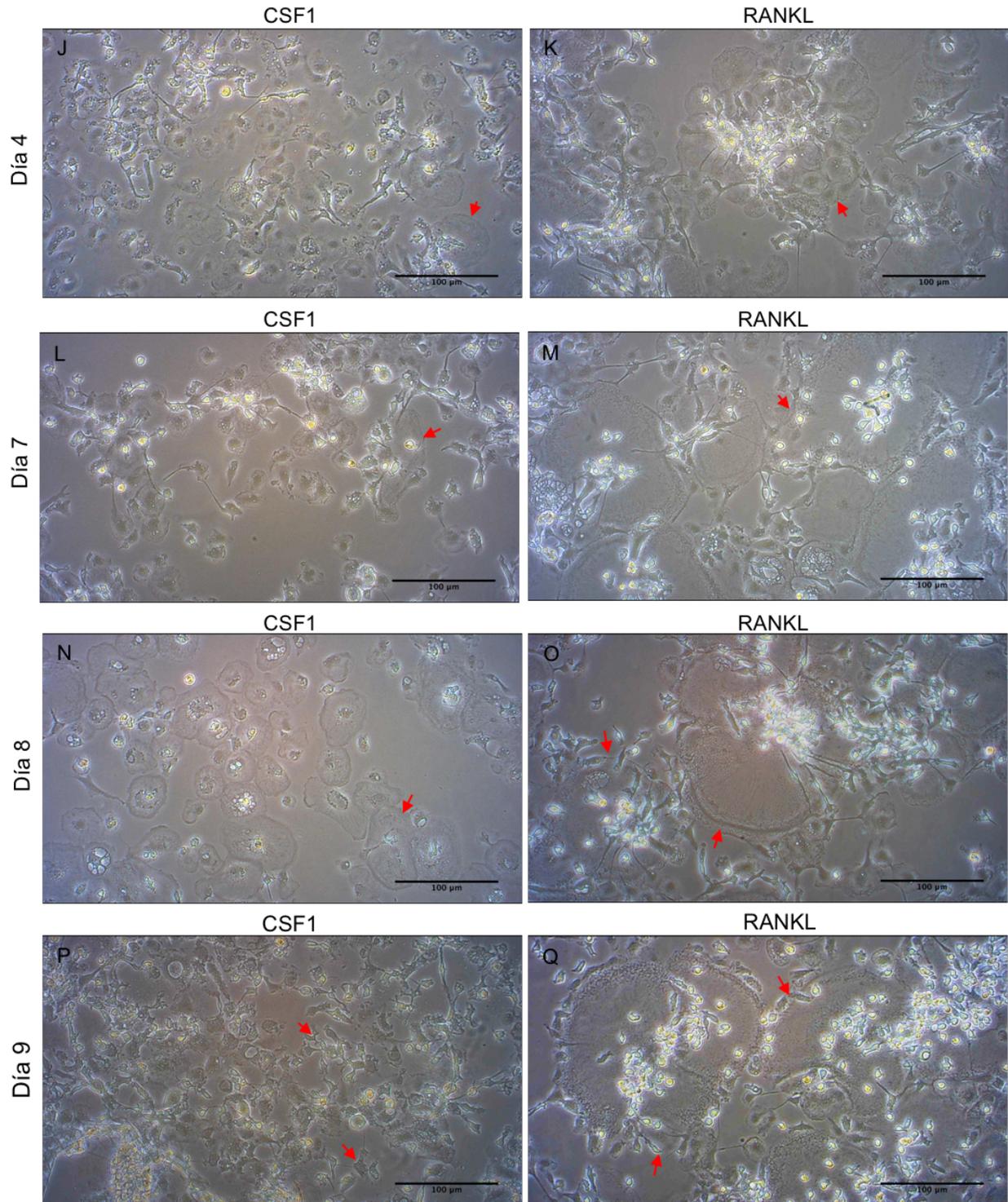


Figura 6.2. Diferenciación de CPM. Columna izquierda. CPM diferenciadas con 20% de CSF1 a lo largo del proceso de diferenciación. Columna derecha. CPM diferenciadas con 5% de RANKL a lo largo del proceso de diferenciación. Objetivo: 20X.

La optimización de las condiciones requeridas para la diferenciación presentó que en los pozos adicionados con 20% de CSF1 0% de RANKL generaron gran cantidad de MAC (Figura 6.2P) que presentan el fenotipo característico de MAC en cultivo (Garceau *et. al*, 2015) con una forma que asemeja a un “huevo frito”. Se observó que las CPM en medio

enriquecido con 20% CSF1 se diferenciaban en MAC a partir del segundo día (Figura 6.2F, flechas rojas), después del cual las células proliferan.

Por otro lado, el cultivo adicionado con 5% RANKL y 0% CSF1 dio como resultado una gran cantidad de células multinucleadas (Figura 6.2Q), las cuales presentan un fenotipo similar al reportado para OST de ratón cultivados *in vitro* (Moon *et. al*, 2013).

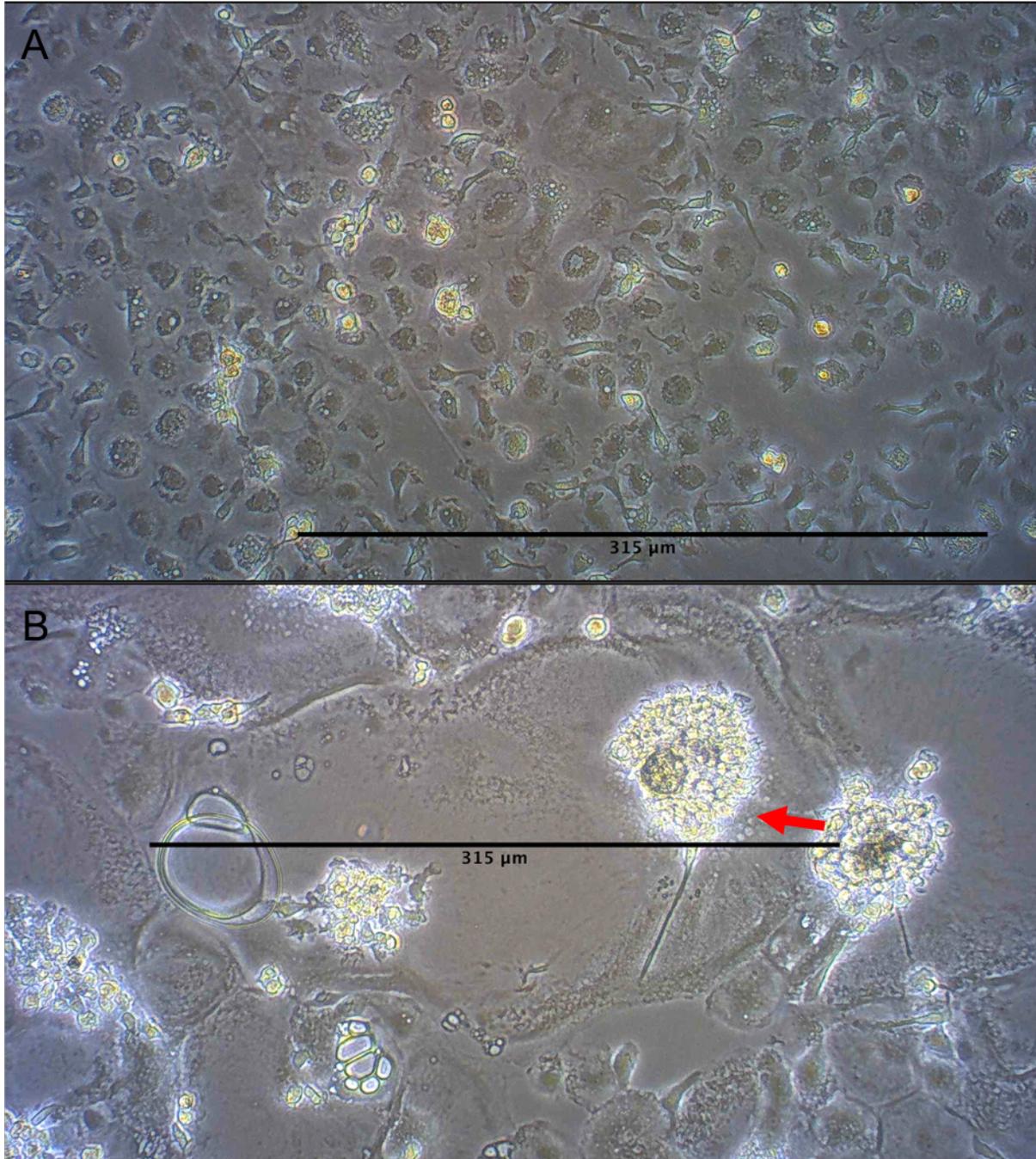


Figura 6.3. Macrófago vs célula multinucleada. A. Macrófagos al día 9 de la diferenciación de CPM en medio enriquecido con 20% de CSF1. B. Célula multinucleada encontrada al día 9 de la diferenciación de CPM en medio enriquecido con 5% de RANKL. Los núcleos se encuentran señalados por una flecha roja. Objetivo: 20X.

6.1.3 Microscopía y tinción de GIEMSA y fluorescente

El décimo día de la diferenciación las células fueron fijadas y teñidas. El objetivo de colocar dos cubreobjetos cubiertos de FCS en la caja de 60mm era obtener suficientes OST y MAC para ser teñidos con ambas tinciones.

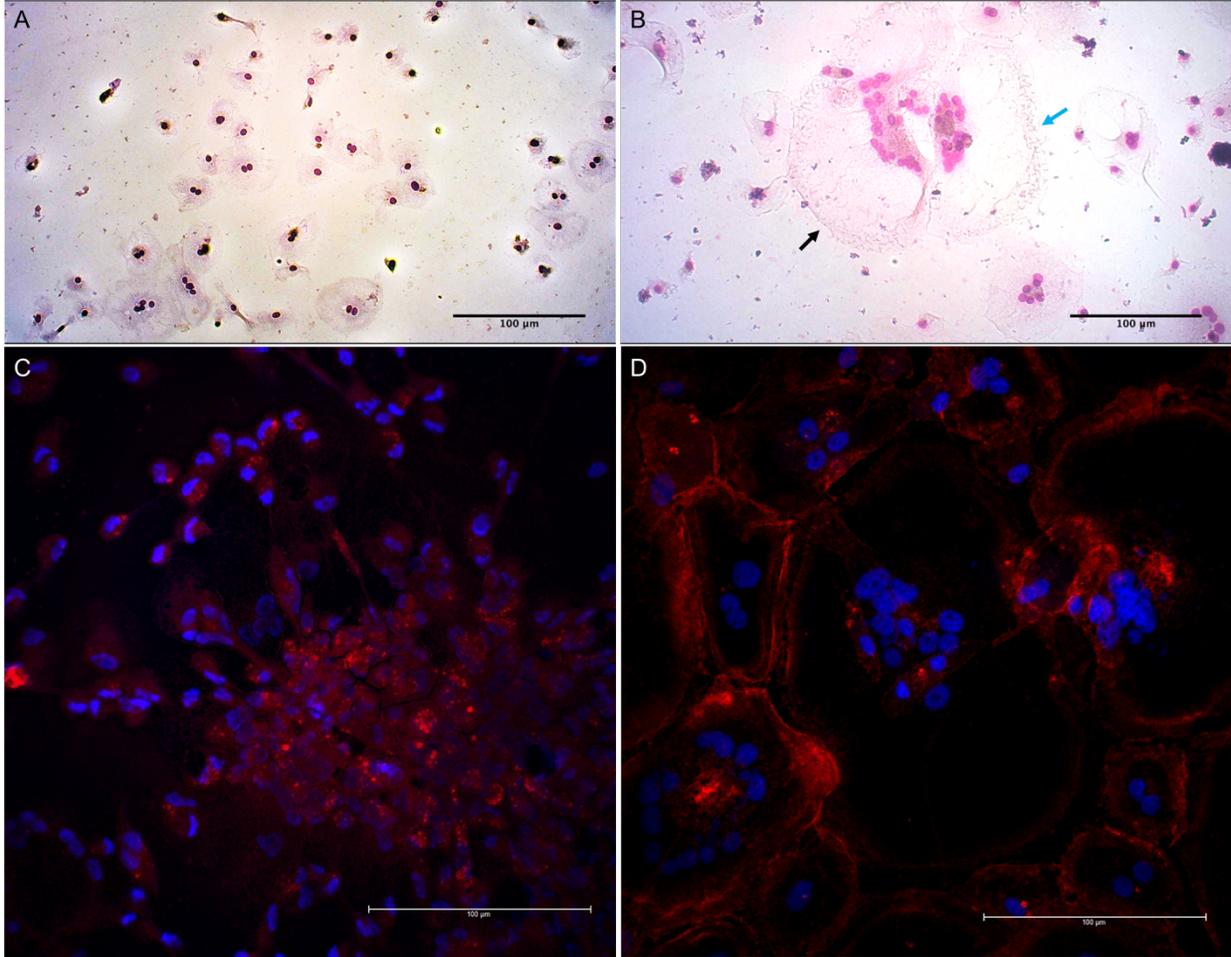


Figura 6.4. MAC y OST. A. MAC teñidos con GIEMSA. B. OST teñidos con GIEMSA. Objetivo: 20X. C. MAC teñidos con HOECHST y faloidina. D. OST teñidos con HOECHST y faloidina. Objetivo 40X.

La tinción de GIEMSA es habitualmente empleada para la tinción de muestras de sangre y células de médula ósea (Barcia, 2007), esta tinción permitirá distinguir los núcleos en varios tonos de morado, mientras que el citoplasma se teñirá en varios tonos de rosa (Brown *et.al*, 1993).

La Figura 6.4A muestra MAC cuyas membranas presentan un color rosado claro, mientras que los núcleos se ven en color morado. Como se precisó anteriormente, aunque con poca frecuencia, se observan células que se fusionaron entre sí, sin embargo, el tamaño de las células y el número de núcleos es notablemente menor que en el cultivo con 5% RANKL.

Los OST teñidos presentan su membrana celular en color rosado claro y sus núcleos agrupados en color fucsia. La Figura 6.4B muestra dos células multinucleadas de aproximadamente 100 µm de ancho, la célula señalada con una flecha azul presenta veintiocho núcleos, mientras que la célula adyacente marcada con una flecha azul presenta veinte

núcleos en su interior. Aunque han logrado dilucidarse algunos factores que participan en la fusión de precursores como la acidosis (Yuan *et. al*, 2016), y las moléculas que participan en la fusión de las CPM (Tiedemann *et. al*, 2013; Miyamoto, 2013); no se conocen con claridad los factores involucrados para terminar el proceso de fusión de precursores, o el número máximo de núcleos que puede llegar a tener un OST.

HOECHST es un colorante fluorescente para DNA, el cual puede ser excitado a una longitud de onda de aproximadamente 350 nm y emite una longitud de onda de 460 nm (Hawley, 2004), por otro lado la faloidina tiñe selectivamente F-actina, es excitado con una longitud de onda de 590 nm y emite una longitud de onda de 608 nm (Thermo Scientific, s.f.).

En la Figura 6.4C se ven macrófagos con la membrana plasmática teñida con rojo y se observa que las células cuentan con un solo núcleo (en azul) en su interior; y en contraste, en la Figura 6.4D se observa una célula de aproximadamente 100 μm de ancho, con 13 núcleos en su interior colindada por células que de igual manera presentan múltiples núcleos en su interior.

Para evidenciar la diferencia entre las medias del número de núcleos por célula presentes en los cultivos enriquecidos con CSF1 o RANKL, se contaron los núcleos por célula en cuatro campos de cada cultivo, en el caso de los OST, sólo fueron contadas aquellas células que presentaban tres o más núcleos, por considerarse un límite estándar en los OST (Diepenhorst *et. al*, 2017). En la Figura 6.5 se muestra el gráfico de caja y bigotes generado en R, donde puede apreciarse de forma ilustrativa que las medias (Figura 6.5, línea negra dentro de la caja) de ambos cultivos no son iguales, y pese a que el máximo valor del grupo MAC coincide con el valor mínimo del grupo OST; el primer cuartil de este último no coincide con el tercer cuartil del grupo MAC, lo que significa que al menos el 50% de los datos del grupo OST son diferentes a los del grupo MAC. La gráfica también demuestra que en el grupo de MAC nunca se encontraron células con más de cuatro núcleos, dato que además está representado como atípico.

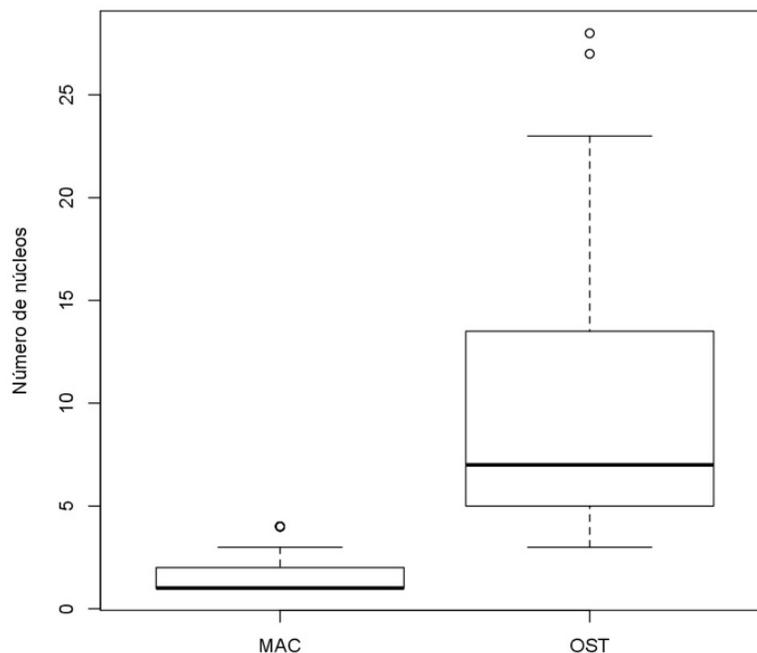


Figura 6.5. Gráfico de caja y bigotes de los datos del número de núcleos provenientes de MAC y OST. Gráfico generado en R 3.3 GUI® Las líneas gruesas dentro de las cajas representan la media de ese grupo de datos.

6.2 Microarreglo

6.2.1 Análisis cualitativo del microarreglo de RNA

El análisis realizado en el software Expression Console (Figura 6.6) tiene como objetivo evaluar la calidad de las muestras. Es un gráfico de la intensidad relativa de cada muestra; es decir que calcula el radio entre la señal de expresión con la media del tratamiento o muestra, es por esto que puede observarse una distribución diferente entre las seis muestras, señal de que existen diferencias en la expresión entre los diferentes tratamientos. Pese a esta variación, un indicativo de la calidad de las muestras es la uniformidad entre las medias de la expresión relativa de cada muestra (Affymetrix, 2012), característica que puede observarse en la Figura 6.6, donde se representa con una línea roja la similitud entre dichos valores.

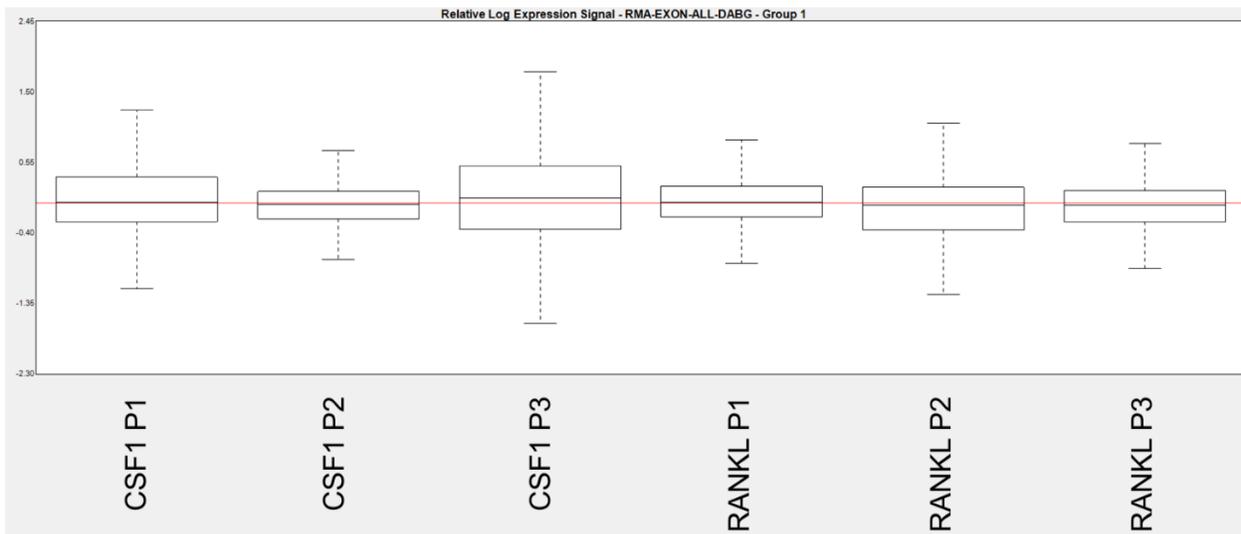


Figura 6.6. Gráfico de caja y bigotes de los datos de expresión. Gráfico generado en Expression Console® Con una línea roja se representa la igualdad de las medias de todas las muestras.

Posteriormente, los datos obtenidos se analizaron con el software BioLayout 3D Express® que permite agrupar las sondas del microarreglo en clases según el patrón de expresión que presentan, además; ofrece una visión global de todas las clases de genes y cómo éstas interaccionan entre sí, generando una red compleja con nubes de nodos aglomerados. Los clústers de aquellas sondas expresados de manera enriquecida en OST y en MAC fueron identificados (Figura 6.7A). El color de cada nodo representa la clase a la que ese cluster pertenece, y las clases se agrupan de ese modo porque poseen un patrón de expresión similar (Figura 6.7 A y B).

La red compleja de clusters (Figura 6.7 A) permite una visualización globalizada de las relaciones entre las clases de genes de uno o ambos tipos celulares. En la Figura 6.7A se aprecia una pequeña conexión entre ambas nubes de nodos, que representan las clases de genes compartidos por OST y MAC, dado el linaje celular que comparten.

Se hizo una comparación entre algunas clases de los dos tipos celulares con gráficos diferenciales, (Figura 6.7 B y C) en donde los ejes x se colocaron los dos grupos triplicados, primero MAC (CSF1) y luego OST (RANKL) y en los ejes y la intensidad de expresión.

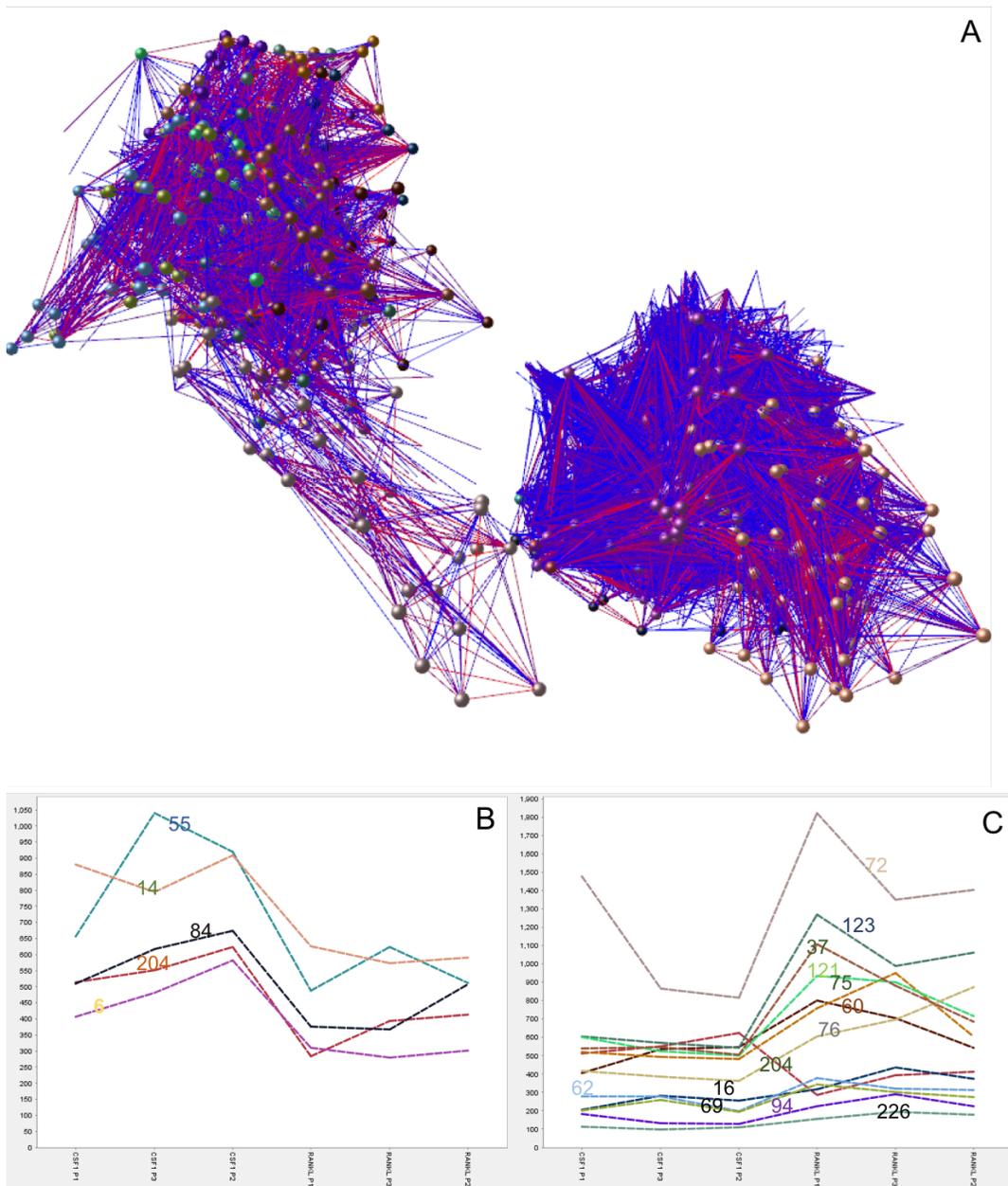


Figura 6.7. Gráficos generados con BioLayout 3D. A. Red compleja que agrupa las sondas asociadas a OST (izquierda) y a MAC (derecha). B y C. Gráfico diferencial de las clases de genes expresadas mayormente en MAC (B) y en OST (C)

Los mapas de calor generados de todas las sondas o de una muestra de veinte de las sondas altamente expresadas en OST dan una representación de la homogeneidad de los datos de cada muestra. Las tonalidades de verde indican que esa sonda (Figura 6.8, indicados en las filas) no se encuentra altamente expresado en esa muestra (Figura 6.8, CSF1 o RANKL, indicados en las columnas); mientras que las tonalidades rojas indican que esa sonda está altamente expresada en esa muestra en particular. Por último, las tonalidades negras indican que esa sonda no se expresa en esa muestra lo suficiente como para que le sea asignada una tonalidad verde o roja, es decir que su radio de expresión con respecto a la otra muestra, es igual o muy cercano a 1.

El mapa de calor de la Figura 6.8A presenta que las tres muestras de CSF1 no se parecen a las tres muestras de RANKL sin embargo se parecen entre sí, mientras que el mapa de calor de la Figura 6.8B representa la diferencia en la expresión de veinte de las sondas más expresadas en OST, de modo que las muestras de CSF1 presentan tonalidades de verde, señal de que dichas sondas no están altamente expresadas en MAC; en contraste, las tres muestras de RANKL presentan tonalidades de rojo, lo que indica que las sondas representadas están altamente expresadas en OST.

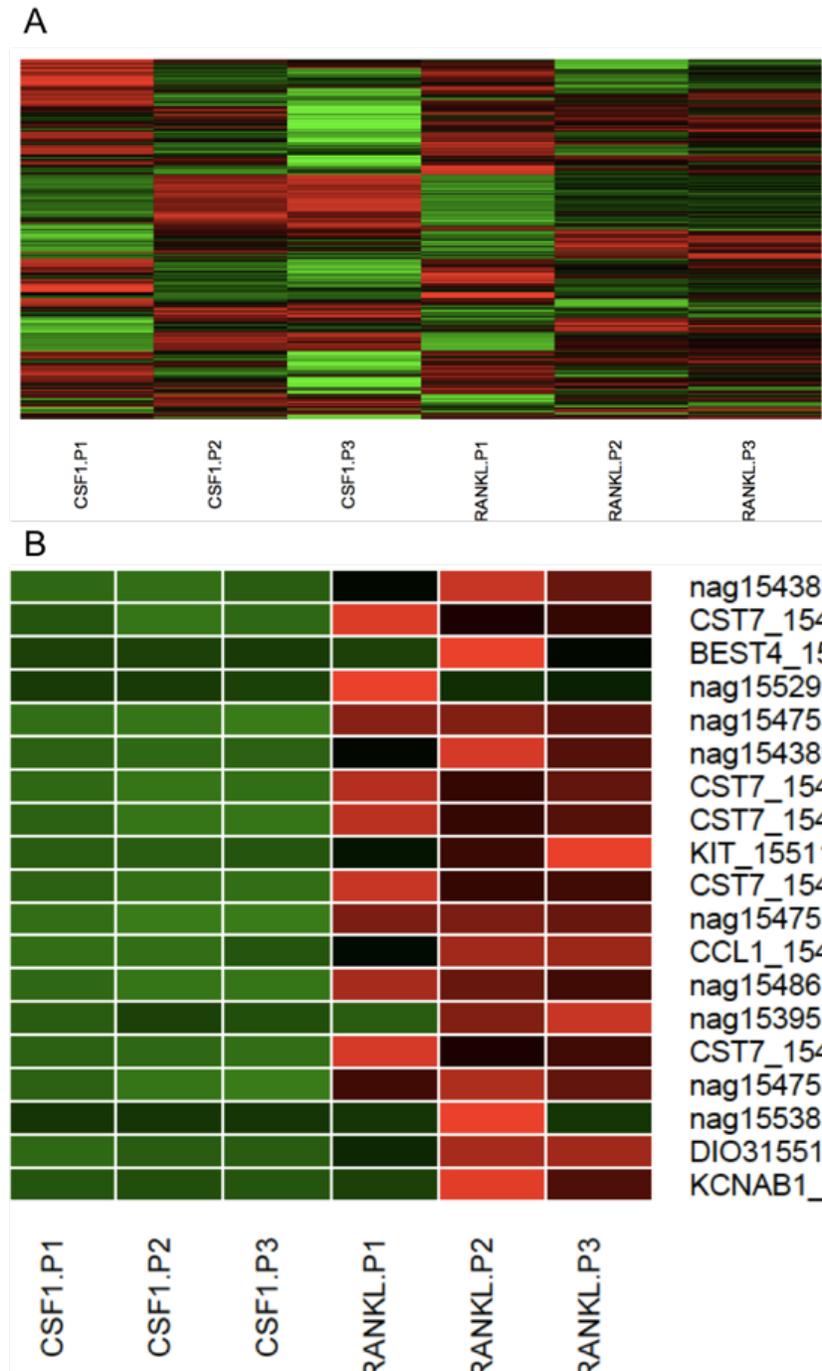


Figura 6.8. Mapa de calor de MAC (CSF1) y OST (RANKL). A. Se representan todas las sondas que conforman el microarreglo. B. Mapa de calor donde se muestra la intensidad de expresión en veinte de las sondas más expresados en OST (Ver Tabla 5.1), se le denomina “nag” a una sonda que corresponde a un gen no anotado (non annotated gene).

6.2.2. Anotación funcional

Del análisis primario de los datos cuantitativos del microarreglo que incluye la ordenación de los datos en función de los radios de expresión, se obtiene una lista ordenada de las sondas que se expresan en mayor cantidad en un tipo celular u otro. Se encontraron sondas no anotadas correspondientes a genes cuya función está reportada en la osteoclastogénesis y en la absorción ósea. Adicionalmente se encontraron sondas no anotadas correspondientes a genes cuya función en el OST no está reportada, sin embargo se encuentran altamente expresados en OST.

En la Figura 6.9 se muestra un gráfico de dispersión de la expresión promedio de cada sonda (Tabla 6.1, columnas “X CSF1” y “X RANKL”). Aquellas sondas que se expresan igualmente en MAC y en OST se encontrarán dispuestas sobre la recta de pendiente 1 (Figura 6.9, en color azul). Por otro lado, aquellas sondas cuya expresión se encuentra más enriquecida en OST (Figura 6.9, en color verde), se dispondrán por encima de las sondas en azul; y las sondas cuya expresión esté enriquecida en MAC (Figura 6.9, en color rojo) se encontrarán por debajo de las sondas color azul.

Gracias a este gráfico se puede visualizar que las sondas se expresan diferencialmente en cualquiera de los tres casos, expresión enriquecida en OST, expresión equivalente en OST y MAC (OST/MAC), y expresión enriquecida en MAC. Teniendo un total de sondas igual a 165,995; basándose en los radios de expresión hay 3519 sondas correspondientes a genes expresados preferencialmente en OST, 67,784 sondas expresadas de forma equivalente en ambos tipos celulares, y 94,689 sondas expresadas preferencialmente en MAC; situación que puede apreciarse visualmente en la Figura 6.9, donde la nube de puntos rojos es más grande comparada con la nube de puntos verdes.

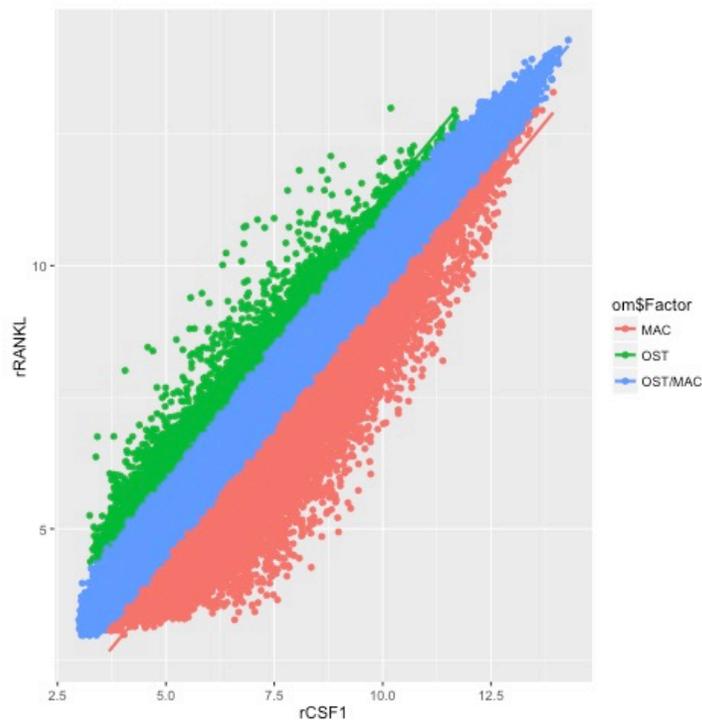


Figura 6.9. Gráfico de dispersión de la expresión promedio de las muestras de CSF1 y RANKL. En color verde se representan las sondas más expresadas en OST, en azul se muestran las sondas que se expresan igualmente en ambos tipos celulares, y en rojo se representan las sondas más expresadas en MAC.

Siendo que la matriz de datos tiene un tamaño considerable (10x165,995), en la Tabla 6.1 se enlistan las señales de expresión de las veinte sondas más expresadas en OST y de las veinte más expresadas en MAC. En ambas secciones se marcó en color gris aquellas sondas anotadas cuyo número de identificación (Tabla 6.1, “Gene Symbol/Probe Set”) está precedido por el nombre del gen al cual esa sonda pertenece, y permanecen en blanco las sondas no anotadas, cuyo número de identificación está precedido por tres guiones. Los radios de expresión promedio se colocaron en la última columna de la Tabla 6.1, denominada “CSF1/RANKL”.

Tabla 6.1. Listado de veinte genes enriquecidos en OST y MAC

Tipo celular	Gene Symbol/Probe Set ID	CSF1 P1	CSF1 P2	CSF1 P3	RANKL P1	RANKL P2	RANKL P3	X CSF1	X RANKL	CSF1/RANKL
OST	KIT 15511536	12.18482816	13.79354138	23.96749124	110.3917846	210.8859251	450.5526831	16.64862026	257.2767976	0.064710928
	---15486517	194.6634205	66.32054696	73.35645417	2082.181333	1639.215709	1371.329933	111.4468072	1697.575658	0.065650569
	---15475342	168.3943589	91.58986127	85.5995911	1785.534135	1774.35627	1617.544851	115.1946038	1725.811752	0.06674807
	---15538145	28.06898518	25.26604595	18.45564176	17.38278092	1008.218768	23.37604572	23.9302243	349.6591982	0.06843871
	CST7 1548652	116.8778715	69.25695244	65.21794149	1722.502068	912.9790848	990.2555008	83.78425515	1208.578885	0.069324606
	KCNAB1 15550	42.08724004	66.56606584	33.92067562	114.8757922	1237.969452	661.277498	47.5246605	671.3742474	0.070787137
	DIO315517745	47.53186156	164.1816408	203.4143996	663.7200287	2500.342474	2457.916176	138.3759673	1873.992893	0.073840177
	CST7 1548651	458.6789851	175.7193186	174.219343	4820.743653	2697.000362	3249.968456	269.5392156	3589.23749	0.075096512
	CST7 1548652	114.4288482	69.47403571	53.88242962	1564.916538	684.7445177	851.4783278	79.26177118	1033.713128	0.076676758
	---15438902	27.21407321	18.05020103	32.71456086	174.2808205	517.3486304	307.112197	25.99294504	332.9138826	0.078077084
	---15438903	49.05502422	25.26604595	96.24495407	371.3860975	1034.716625	727.8856438	56.85534142	711.3294555	0.079928282
	---15475339	400.2126614	175.0004716	96.97937157	2213.202894	3476.403915	2574.024375	224.0641682	2754.543728	0.081343478
	CC11 1544450	72.41592046	42.0566199	219.9395125	659.303989	1746.414139	1692.722774	111.4706843	1366.146967	0.081594943
	CST7 1548652	213.9098343	106.8739918	145.051761	2188.838809	1267.403334	1610.496712	155.278529	1688.912952	0.091939924
	---15475341	210.0650004	181.5526276	149.922489	2039.68408	1994.221576	1697.693142	180.5133724	1910.532933	0.094483256
	---15529943	44.52059596	44.59944957	24.28093378	957.1525048	84.28009294	117.7945515	37.80032644	386.4090498	0.097824641
	CST7 1548652	192.3162687	38.22562009	91.24142035	1678.701496	722.026511	853.8388518	107.261103	1084.85562	0.098871316
	BEST4 155436	10.33794122	9.234200131	12.48697398	10.95990965	256.9771014	55.15948187	10.68637178	107.698831	0.099224585
	---15395537	16.44995805	107.2281583	68.18275551	23.48679578	799.719358	1053.555062	63.95362397	625.5870718	0.102229772
	---15488709	65.67015703	460.8105702	829.0555724	30.74261538	39.88874975	53.23344396	451.8454332	41.2882697	10.94367569
---15529055	46.59990149	84.79298446	249.885954	12.69496929	12.74474851	9.353050648	127.0929466	11.59758948	10.95856573	
---15418942	34.38546618	114.7230123	597.7191686	23.22830536	11.89721508	32.41332238	248.942549	22.51294761	11.05775012	
MAC	LIMCH115511	27.41459014	139.7194443	508.0525787	12.39436969	16.07845636	30.93383936	225.0622044	19.8022218	11.36550265
	---15562501	9.839315815	72.27681361	337.2192304	12.69496929	9.323482953	14.29026733	139.7784533	12.10290652	11.54916408
	---15432196	47.98002486	168.8858912	472.7193139	18.21127467	20.66227207	18.89693042	229.8617433	19.25682572	11.93663726
	---15386676	443.8858778	12.69496929	25.49601733	14.515929	14.46394308	11.09374835	160.6922882	13.35787347	12.02978067
	---15452440	15.06125412	83.80149056	298.7193742	9.868255027	13.7346477	8.629488211	132.527373	10.74413031	12.33486277
	CDC42BPA 154	59.10769269	233.3859658	518.0523207	10.1816396	26.87008537	28.1782283	270.1819931	21.74331776	12.42597823
	LUM 1539930	60.96612727	1164.027962	1316.461851	31.72593989	80.87629484	84.94628797	847.1519804	65.84950757	12.86497062
	---15435801	63.14422982	323.2194039	278.0525967	29.01851928	8.776167129	13.7346477	221.4720768	17.1764447	12.89394171
	FAT115511289	61.85194252	379.2194103	1325.306196	11.53657442	52.46469452	71.27899052	588.7925162	45.09341982	13.0571715
	---15539435	51.98055022	662.3858299	1369.221371	25.04882456	51.21768001	82.810741	694.5292503	53.02574852	13.09796221
	TOP2A 154823	56.87875573	146.8859912	332.0526035	10.91685205	8.629488211	20.74232918	178.6057835	13.42955648	13.2994551
	LUM 1539930	29.93656942	382.9892266	748.4110244	23.48679578	31.63417354	31.63417354	387.1122735	28.91838095	13.38637437
	---15531939	50.45358923	611.7193067	834.5525004	26.74475347	47.98002486	36.36037062	498.9084655	37.02838298	13.47367682
	---15496448	72.3471861	769.6874961	1001.69043	24.89222005	44.16458347	56.62663908	614.5750372	41.89448087	14.66959429
	COL11A11553	13.06637459	201.7192561	357.3859232	10.77210282	10.3732783	16.58911479	190.7238513	12.5781653	15.1630899
	---15418935	102.5660174	290.052652	1124.38469	26.11804488	21.16468336	44.82308369	505.6677866	30.70193731	16.47022406
	---15475786	537.8861383	206.7192599	235.8860023	14.515929	16.44995805	26.87008537	326.8304669	19.27865747	16.95296819

Dentro de los genes anotados cuya expresión se encontró enriquecida en OST, se encuentra el gen KIT, el cual es un receptor tirosina kinasa al igual que CSF1R, y se ha reportado que los precursores de OST expresan preferencialmente c-kit pero no c-fms, el gen que codifica para CSF1R, esto sugiere que los OST pueden derivar de células hematopoyéticas positivas para c-kit que en algún punto de la osteoclastogénesis, pasaron por una fase dependiente de CSF1R (Hayashi *et. al*, 1997). Asimismo, c-KIT es fundamental para etapas tardías de la osteoclastogénesis (Arai *et. al*, 1999).

La cistatina F, codificada por el gen CST7, pertenece a la familia de las cistatinas, las cuales son importantes inhibidores de proteasas cisteínicas, entre ellas la catepsina K (Schüttelkopf, *et. al*, 2006), se expresa casi exclusivamente en células hematopoyéticas como monocitos, y se acumula en organelos lisosómicos (Halfon *et. al*, 1998). Se ha reportado la expresión de varios tipos de cistatina en OST (Yamaza *et. al*, 2001), en particular la cistatina C, se encontraron deposiciones en fibrillas de colágeno y entre las fibrillas en la matriz ósea de la laguna de reabsorción, lo que sugiere que la cistatina C regula proteínas de la matrix extracelular. Adicionalmente, se ha visto que la cistatina C dimeriza en ambientes muy ácidos, y la forma dimérica de la cistatina es incapaz de inhibir proteinasas cisteínicas (Ekiel y Abrahamson, 1996), por esta razón, se cree que la forma dimérica de la cistatina C preserva la actividad de la catepsina K, que actúa en ambientes ácidos durante el proceso de reabsorción; lo que constituye un proceso de regulación negativa interna de la reabsorción.

DIO3 es el gen que codifica para la iodotironina deiodinasa tipo 3, que cataliza la inactivación de las hormonas tiroideas (Van der Geyten *et. al*, 1997), y se sabe que las hormonas tiroideas están estrechamente involucrada en el desarrollo óseo (Williams y Basset, 2011). En particular, DIO3 inhibe las hormonas tiroideas T₃ (3,5,30-L-triiodothyronine) y T₄ (3,5,30,50-L-tetraiodothyronine), las cuales en su forma libre, entran al tejido óseo mediante transportadores monocarboxílicos como MCT8, el cual está extensamente expresado en osteoclastos (Williams y Basset, 2011). Está reportada la actividad enzimática presente de DIO3 en células monocíticas en presencia de RANKL, y en osteoclastos primarios, lo que sugiere que la disponibilidad local de las hormonas tiroideas en el tejido óseo es controlada principalmente por la presencia de DIO3 (Williams *et. al*, 2008).

Aunque fueron encontrados genes estrechamente involucrados en la osteoclastogénesis o en la reabsorción ósea, no fueron encontrados genes característicos de OST, como el gen de la catepsina K, o el responsable de la fusión OC-STAMP, ACP5 que codifica para la enzima TRAP, o el gen de la anhidrasa carbónica CA2. La principal suposición consiste en que el estudio se realizó en OST no activados por una matriz ósea, dicho proceso estimularía la expresión de genes característicos del proceso de reabsorción.

La identificación de las sondas no anotadas con expresión enriquecida en OST se enlistan en la Tabla 6.2, donde además se especifica la herramienta empleada para la búsqueda y se anexa una breve descripción de su función reportada en OST.

RGS3 es un miembro de la familia RGS (*regulators of G proteins signalling*) y se ha probado su rol como inhibidor de GTPasas (Scheschonka *et. al*, 2000) cuya actividad tiene gran importancia en la reabsorción ósea (Itztein *et. al*, 2011). Muchas proteínas RGS pueden promover la osteoclastogénesis (Fisher, 2015); ha sido reportado que RGS10, otro miembro de la familia RGS, dramáticamente incrementa la osteoclastogénesis mediante señalización RANKL cuando se expresa ectópicamente, mientras que ratones *knock out* para RGS10 sufren de osteopetrosis severa además de que el proceso de diferenciación de osteoclastos está dañado (Mao *et. al*, 2011). De acuerdo con el autor, RGS10 constituye un blanco terapéutico potencial para enfermedades óseas.

El receptor de 5-hidroxitriptamina acoplado a adenilato ciclasa 7, HTR7 (*adenilate-cyclase-coupled 5-hydroxytryptamine receptor 7*) regula efectos del desarrollo y proliferación de los osteoclastos (Marosy *et. al*, 2010). Mientras que el rol principal de las moléculas como HTR7 tienen que ver con el Sistema nervioso central, la serotonina (*5-hidroxitriptamina, 5-HT*) participa en el metabolismo del hueso mediante su transportador (5-HTT) (Warden y Haney, 2008), porque su presencia ha sido identificada en osteoblastos (Dai *et. al*, 2014), osteocitos (Bliziotis *et. al*, 2006), y OST (Battaglino *et. al*, 2004).⁹

Tabla 6.2. Registro de la búsqueda de las sondas de acuerdo a la herramienta de búsqueda empleada

Genes	Probe Set ID	Herramienta	Resultado de la búsqueda	Observaciones
C11ORF34	15475342	Netaffx	C11ORF34	Se encontraron regiones conservadas en los genomas de pato y pavo usando el BLAT de Ensembl.org. La misma secuencia se emplea en las tres pruebas.
		Netaffx-BLAT	ENSGALG00000007846	
	15475339	Netaffx	C11ORF34	
		Netaffx-BLAT	ENSGALG00000007846	
	15475341	Netaffx	C11ORF34	
		Netaffx-BLAT	ENSGALG00000007846	
ENSGALG00000012416	15387860	Netaffx	Ninguno	Se encontraron regiones conservadas en los genomas de varias especies.
		Netaffx-BLAT	ENSGALG00000012416	
RGS3	15438902	Netaffx	ninguno	Descrito en los genomas de humano y ratón. Tiene actividad relacionada con GTPasas (Scheschonka et. al, 2000)
		Netaffx-BLAT	RGS3	
	15438901	Netaffx	Ninguno	
		Netaffx-BLAT	Ídem	
	15438903	Netaffx	Ninguno	
		Netaffx-BLAT	Ídem	
HTR7	15529943	Netaffx	Ninguno	Descrito en los genomas de humano y ratón. Está relacionado con actividad de OST (Marosy et. al, 2010)
		Netaffx-BLAT	HTR7	
FLT1	15395537	Netaffx	FLT1	Descrito en los genomas de humano y ratón. Se encuentra en precursores de OST. (Yuiko et. al, 2008)
	15395539	Netaffx	ninguno	
		Netaffx-BLAT	FLT1	
	15395532	Netaffx	Ninguno	
		Netaffx-BLAT	FLT1	
	15395530	Netaffx	ninguno	
Netaffx-BLAT		FLT1		
15395540	Netaffx	Ninguno		
	Netaffx-BLAT	FLT1		
ADTRP	15451808	Netaffx	C2H6ORF105	No se encuentra descrito en los genomas de humano ni ratón. No se encontró evidencia adicional a nuestros descubrimientos de su expresión en OST.
		Netaffx-BLAT	ADTRP	

Se ha demostrado que tanto VEGF (*vascular endothelial growth factor*) y PIGF (*placental growth factor*) pueden sustituir a CSF1 durante la osteoclastogénesis en ratones osteopetróticos mediante la señalización de FLT1 (*Fms Related Tyrosine Kinase 1*), ya que éste es un receptor en común entre VEGF y CSF1 (Nakawaga et. al, 2000).

Adicionalmente, se ha observado que FLT1 se expresa en precursores de OST (Yuiko *et. al*, 2008) y se ha visto que promueve directamente la actividad de los osteoclastos y su supervivencia (Nakagawa *et. al*, 2000).

ADTRP es un gen que codifica para una proteína reguladora de TFPI (*tissue factor pathway inhibitor*) dependiente de andrógenos (*androgen-dependent TFPI-regulating protein*). Aunque no hay evidencia de expresión de ADTRP ni de TFPI en OST, los descubrimientos sugieren que varios receptores dependientes de andrógenos pueden encontrarse en OST y que están involucrados en la reabsorción de hueso y la diferenciación de OST. Por ejemplo en ratones se ha demostrado que receptores de andrógenos pueden encontrarse en OST mediante localización inmunohistoquímica (Mizuno *et. al*, 2001).

Otro estudio sostiene que la testosterona (Te) inhibe la osteoclastogénesis inducida por PTH (*parathyroid hormone*) mediante el receptor de andrógenos (Chen *et. al*, 2001), mientras que otro estudio reafirma lo anterior por reportar la estimulación en la producción de OPG en células de osteosarcoma co-cultivadas con precursores de OST, estrógeno (E2) y Te en el medio; lo que implica que la fusión de precursores no ocurre. Sin embargo, los efectos de E2 y Te en la fusión de los precursores y la actividad de OST fueron completamente compensados por un antagonista de E2, y por un antagonista del receptor de andrógenos, entre otros (Michael *et. al*, 2005).

Como también se muestra en la Tabla 6.2 se encontraron dos sondas no anotadas. La primera de ellas está descrita en bases de datos como C11ORF34, lo que significa que es un marco de lectura abierto que se encuentra en el cromosoma 24; la otra sonda no anotada está denominada en bases de datos como ENSGALG00000012416, identificada como una secuencia codificadora de proteínas, esta secuencia se encuentra en el cromosoma 1. Están descritas en la base de datos NetAffx™ Analysis Center (Affymetrix, 2017), como secuencias codificantes de genes o como marcos de lectura abierto, y no sólo están altamente expresados en OST sino que además son específicos de pollo, debido a que no se encontraron homologías en los genomas humano ni murino. Sin embargo, sí se encontraron homologías con otras especies, como el pato (*Anas platyrhynchos*), pavo (*Meleagris gallopavo*), pinzón cebrado (*Taeniopygia guttata*), ornitorrinco (*Ornithorhynchus anatinus*), y tortuga china de caparazón blando (*Pelodiscus sinensis*), sin haberse encontrado un gen anotado en ninguno de los genomas de dichas especies.

En la Tabla 6.3 se muestran los resultados correspondientes a las sondas 15475342, 15475339, y 15475341, las cuales corresponden al marco de lectura abierto 34 ubicado en el cromosoma 11 (C11ORF34). Estas sondas presentaron homología en los genomas del pato y del pavo, aunque en diferentes ubicaciones. En el caso del pato, la secuencia homóloga se encuentra en el cromosoma 1 (KB746795.1:162398-162467), mientras que en el pavo la secuencia homóloga se encuentra en el cromosoma 26 (26:6518954-6519061). En ningún caso se encontró algún gen anotado a esta secuencia, además de que no se encontraron regiones conservadas en los genomas del pinzón cebrado, ornitorrinco, o tortuga china de caparazón blando. Las homologías encontradas en estos organismos sugiere que dicho marco de lectura abierto está asociado a un gen que no solamente está altamente expresado en OST, sino que también es específico de ave.

La Tabla 6.4 muestra los resultados de la búsqueda de homologías para la sonda 15387860, que según el sitio NetAffx™ corresponde a una secuencia codificadora de proteínas identificada en el sitio Ensabl.com como ENSGALG00000012416. Esta secuencia presenta homologías en los genomas del pato, del pavo, del ornitorrinco, del pinzón cebrado y de la tortuga china de caparazón blando (Tabla 6.4, columna Organismo). Las secuencias homólogas a esta sonda se ubican todas en los cromosomas 1 de los organismos enlistados. Esta sonda es homóloga a secuencias identificadas en Ensabl.com como codificadoras de proteínas en todos los genomas encontrados (Tabla 6.4, columna Gen(es) superpuestos). Estas homologías sugieren que esta sonda pertenece a un gen que es específico de organismos

ovíparos, de modo que pudiera encontrarse algún proceso específico de dichas especies involucrado en la homeóstasis del hueso.

Tabla 6.3. Resultados obtenidos de la búsqueda BLAST de Ensembl.com en varias especies para las sondas 15475342, 15475339, y 15475341.

Organismo	Ubicación en el genoma	Gen(es) superpuestos	Orientación	Inicio	Fin	Tamaño	Puntuación	E-val	%ID
Pollo (<i>Gallus gallus</i>)	24:6121443-6121658	ENSGALG00000007846	Forward	417	632	216	419	2.00E-117	100.00
Pato (<i>Anas platyrhynchos</i>)	KB746795.1:162398-162467	-	Reverse	175	244	70	112	6.70E-25	88.57
Pavo (<i>Meleagris gallopavo</i>)	26:6518954-6519061	-	Forward	251	358	108	183	2.10E-46	91.67

Tabla 6.4 Resultados obtenidos de la búsqueda BLAST de Ensembl.com en varias especies para la sonda 15387860.

Organismo	Ubicación en el genoma	Gen(es) superpuestos	Orientación	Inicio	Fin	Tamaño	Puntuación	E-val	%ID*
Pollo (<i>Gallus gallus</i>)	1:51006152-51006577	-	Forward	524	949	426	829	6.40E-241	100
Idem	1:51005673-51006028	ENSGALG00000012416	Forward	365	720	356	689	1.50E-198	99.44
Pato (<i>Anas platyrhynchos</i>)	KB742823.1:382075-382300	ENSAPLG00000015707	Forward	139	364	226	376	2.10E-104	89.82
Pavo (<i>Meleagris gallopavo</i>)	1:50225496-50225764	-	Reverse	681	949	269	463	1.10E-130	93.68
Idem	1:50226160-50226390	ENSMGAG00000012540	Reverse	134	364	231	424	9.70E-119	95.67
Pinzón cebra (<i>Taeniopygia guttata</i>)	1A:50932264-50932492	ENSTGUG00000010529	Forward	136	364	229	384	9.00E-107	90.83
Ornitorrinco (<i>Ornithorhynchus anatinus</i>)	Ultra136:13755-13799	ENSOANG00000008727	Forward	86	130	45	82	7.80E-16	95.56
Tortuga china de caparazón blando (<i>Pelodiscus sinensis</i>)	JH207652.1:560512-560575	ENSPSIG00000011759	Reverse	63	126	64	115	7.60E-26	93.75

7. Conclusiones

El cultivo de células de MO de pollo durante tres días a 37 C con 5% de CO₂ dio como resultado CPM, las cuales presentaron una apariencia más adherida a la superficie; además, este periodo de incubación permitió que las CPM proliferen y que fuera posible separarlas selectivamente de otras células presentes en la MO que no son capaces de diferenciarse en MAC o de fusionarse. Las CPM en medio enriquecido con 20% CSF1 dieron como resultado MAC a partir del cuarto día, mismas que tenían una apariencia similar a un “huevo frito”; en contraste, las CPM cultivadas en medio enriquecido con 5% RANKL dieron como resultado OST a partir del 4, y en el noveno día de la diferenciación se obtuvieron células de hasta 315 μm de diámetro.

En las células teñidas se lograron visualizar células multinucleadas que presentaban hasta veintiocho núcleos; aunado a esto, se observó que en ocasiones también los MAC se fusionaban resultando en células de hasta cuatro núcleos, por esta razón se realizó un gráfico de caja y bigotes que mostró que en cada cultivo las medias en el número de núcleos son diferentes, además de que mostró la diferencia en distribución percentil de dichos datos.

Las sondas que conforman el microarreglo se expresaron diferencialmente en MAC y OST, comportamiento que se visualizó en el gráfico de dispersión y en el gráfico de clústers; gracias al cual se pudieron identificar clases de genes agrupados por la similitud en su patrón de expresión. El mapa de calor mostró que las sondas presentan una señal de expresión similar entre triplicados de los cultivos y diferentes con respecto al otro tipo celular.

Los OST de pollo diferenciados *in vitro* expresaron genes asociados a la función y a la osteoclastogénesis en otras especies, como CST7 y c-KIT; ambos genes estrechamente relacionados con la función y diferenciación de células hematopoyéticas. Asimismo, fueron identificadas sondas altamente expresadas en OST cuya función no se encontraba anotada, después de una búsqueda de homologías se encontraron genes como RGS3, cuya expresión en el OST está reportada que participa activamente en el proceso de absorción ósea, y FLT1, el receptor de VEGF, el cual se ha visto que puede sustituir a VEGF durante la osteoclastogénesis. Ambas observaciones podrían confirmar la identidad genética de las células multinucleadas diferenciadas, sugiriendo que son OST.

Adicionalmente, en el sistema del pollo existen genes no anotados que curiosamente presentan homología solamente en aves u organismos como el ornitorrinco, el pinzón cebra, o la tortuga china de caparazón blando; evidencia de que existen genes específicos de ovíparo que participan en la diferenciación y/o la función del OST.

Gracias a la diferenciación *in vitro* de OST derivados de la médula ósea de pollo y a la identificación de genes no anotados se realizó un aporte al conocimiento del modelo del pollo; además, constituye un precedente en la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos contra enfermedades óseas de alta incidencia en el humano y en el pollo. En suma, los resultados aquí expuestos abrirán paso a nuevas interrogantes y oportunidades en el estudio de este organismo modelo.

8. Perspectivas

Las nuevas interrogantes propuestas en este estudio supondría en un inicio repetir la diferenciación *in vitro*, para extraer mRNA y corroborar por PCR la expresión de los genes anotados como CST7, y DIO3, RGS3 y FLT1 en el modelo del pollo.

Considerando que CSF1 puede ser activado por otros ligandos como IL-34, se buscará efectuar la diferenciación *in vitro* de OST empleando IL-34, y analizar si existen diferencias en la morfología, en la función, o en la expresión de genes entre las células multinucleadas diferenciadas con CSF1 y las diferenciadas con IL-34.

Asimismo, se pretendería encontrar la expresión en OST de pollo genes característicos, relacionados con la diferenciación y función de los OST como ACP5, OC-STAMP y CSTK. Para ello se diferenciarían OST en matriz ósea sintética o bien pasado el tiempo requerido para la diferenciación se expondrían las células multinucleadas a dicha matriz.

Adicionalmente; se plantea evaluar la funcionalidad de los OST diferenciados *in vitro* mediante la observación de lacunas en matriz ósea. Dicho experimento requerirá como grupo control OST primarios, para lo cual ha de optimizarse el protocolo para la extracción de dichas células del hueso de pollos.

Se harán ensayos para determinar el número máximo de núcleos que pueden resultar de la fusión de precursores, de lo que derivarán estudios para determinar la funcionalidad de los OST que posean el mayor número de núcleos. Además de determinar factores adicionales que desempeñan una función regulatoria negativa de la fusión de precursores de OST.

Asimismo, se planea dilucidar la función de los genes no anotados en el modelo del pollo indagando en la homología de dichos genes con mamíferos y ovíparos, respectivamente. Incluso un análisis exhaustivo sobre los genes que se expresan diferencialmente en OST y MAC darán una idea de la brecha genética que existe en estos estrechamente relacionados tipos celulares.

Por último se pretende realizar estudios de qPCR para determinar el perfil de expresión de ciertos genes característicos de OST y encontrados en este trabajo a cada estadio de la osteoclastogénesis.

9. Bibliografía

1. Affymetrix (2012) *Affymetrix Expression Console Software 1.2 User Manual.*, Technote. http://media.affymetrix.com/support/downloads/manuals/expression_console_userguide.pdf
2. Affymetrix, NetAffx™ Analysis Center (2017). <https://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>
3. Amend, S. R., Uluckan, O., Hurchla, M., Leib, D., Veis Novack, D., Silva, M., ... & Weilbaecher, K. N. (2015). Thrombospondin-1 Regulates Bone Homeostasis Through Effects on Bone Matrix Integrity and Nitric Oxide Signaling in Osteoclasts. *Journal of Bone and Mineral Research*, 30(1), 106-115.
4. Anderson, D. M., Maraskovsky, E., Billingsley, W. L., Dougall, W. C., Tometsko, M. E., Roux, E. R., ... & Galibert, L. (1997). A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*, 390(6656), 175-179.
5. Arai, F., Miyamoto, T., Ohneda, O., Inada, T., Sudo, T., Brasel, K., ... & Suda, T. (1999). Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor κ B (RANK) receptors. *Journal of Experimental Medicine*, 190(12), 1741-1754.
6. ASP, *Animals (Scientific Procedures) Act 1986 Amendment Regulations 2012*.
7. Aubin, J. E., Liu, F., Malaval, L., & Gupta, A. K. (1995). Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone*, 17(2), S77-S83.
8. Barcia, J. J. (2007). The Giemsa stain: its history and applications. *International journal of surgical pathology*, 15(3), 292-296.
9. Basle, M. F., Mazaud, P., Malkani, K., Chretien, M. F., Moreau, M. F., & Rebel, A. (1988). Isolation of osteoclasts from pagetic bone tissue morphometry and cytochemistry on isolated cells. *Bone*, 9(1), 1-6.
10. Battaglini, R., Fu, J., Späte, U., Ersoy, U., Joe, M., Sedaghat, L., & Stashenko, P. (2004). Serotonin regulates osteoclast differentiation through its transporter. *Journal of Bone and Mineral Research*, 19(9), 1420-1431.
11. Blizotes, M., Eshleman, A., Burt-Pichat, B., Zhang, X.-W., Hashimoto, J., Wiren, K., & Chenu, C. (2006). Serotonin Transporter and Receptor Expression in Osteocytic MLO-Y4 Cells. *Bone*, 39(6), 1313-1321. <http://doi.org/10.1016/j.bone.2006.06.009>
12. Boman, A., Kokkonen, H., Ärlestig, L., Berglin, E., & Rantapää-Dahlqvist, S. (2017). Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANK) but not sclerostin or gene polymorphisms is related to joint destruction in early rheumatoid arthritis. *Clinical Rheumatology*, 1-8.
13. Boskey, A. L. (2013). Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects. *BoneKEy reports*, 2.
14. Boyle, W. J., Simonet, W. S., & Lacey, D. L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423(6937), 337-342.
15. Brazier, H., Stephens, S., Ory, S., Fort, P., Morrison, N., & Blangy, A. (2006). Expression Profile of RhoGTPases and RhoGEFs During RANK-Stimulated Osteoclastogenesis: Identification of Essential Genes in Osteoclasts. *Journal of Bone and Mineral Research*, 21(9), 1387-1398.
16. Brown, B. A., Hunter, R. C., O'Hare, A., & Erim, G. (1993). *Hematology: principles and procedures* (pp. 1-453). Philadelphia: Lea & Febiger.
17. Cappariello, A., Paone, R., Maurizi, A., Capulli, M., Rucci, N., Muraca, M., & Teti, A. (2015). Biotechnological approach for systemic delivery of membrane Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANK) active domain into the circulation. *Biomaterials*, 46, 58-69.
18. Cold Spring Harbor Laboratories, DNA Learning Center Blogs (s.f.) Recuperado de: <https://www.dnalc.org/resources/3d/26-microarray.html> el 19 de Abril de 2017.
19. Colville, T. P., & Bassert, J. M. (2015). *Clinical anatomy and physiology for veterinary technicians*. Elsevier Health Sciences.

20. Collin-Osdoby, P., & Osdoby, P. (2012). Isolation and culture of primary chicken osteoclasts. *Bone Research Protocols*, 119-143.
21. Cummings, S. R., Bates, D., & Black, D. M. (2002). Clinical use of bone densitometry: scientific review. *Jama*, 288(15), 1889-1897.
22. Chambers, T. J., Thomson, B. M., & Fuller, K. (1984). Effect of substrate composition on bone resorption by rabbit osteoclasts. *Journal of cell science*, 70(1), 61-71.
23. Chen, Q., Kaji, H., Sugimoto, T., & Chihara, K. (2001). Testosterone inhibits osteoclast formation stimulated by parathyroid hormone through androgen receptor. *FEBS letters*, 491(1), 91-93.
24. Dai, S. Q., Yu, L. P., Shi, X., Wu, H., Shao, P., Yin, G. Y., & Wei, Y. Z. (2014). Serotonin regulates osteoblast proliferation and function in vitro. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 47(9), 759-765. <http://doi.org/10.1590/1414-431X20143565>
25. Dai, X. M., Ryan, G. R., Hapel, A. J., Dominguez, M. G., Russell, R. G., Kapp, S., ... & Stanley, E. R. (2002). Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood*, 99(1), 111-120.
26. David, J. P., Neff, L., Chen, Y., Rincon, M., Horne, W. C., & Baron, R. (1998). A New Method to Isolate Large Numbers of Rabbit Osteoclasts and Osteoclast-like Cells: Application to the Characterization of Serum Response Element Binding Proteins During Osteoclast Differentiation. *Journal of Bone and Mineral Research*, 13(11), 1730-1738.
27. Davies, J., Warwick, J., Totty, N., Philp, R., Helfrich, M., & Horton, M. (1989). The osteoclast functional antigen, implicated in the regulation of bone resorption, is biochemically related to the vitronectin receptor. *The Journal of Cell Biology*, 109(4), 1817-1826.
28. Del Fattore, A., Cappariello, A., & Teti, A. (2008). Genetics, pathogenesis and complications of osteopetrosis. *Bone*, 42(1), 19-29.
29. Delmas, P. D., Eastell, R., Garnero, P., Seibel, M. J., Stepan, J., & Committee of Scientific Advisors of the International Osteoporosis Foundation. (2000). The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. *Osteoporosis International*, 11(6), S2-S17.
30. Diepenhorst, N. A., Nowell, C. J., Rueda, P., Henriksen, K., Pierce, T., Cook, A. E., ... & Summers, R. J. (2017). High throughput, quantitative analysis of human osteoclast differentiation and activity. *Analytical biochemistry*, 519, 51-56.
31. Dittmer, K. E., Hitchcock, B., McDougall, S., & Hunnam, J. C. (2016). Pathophysiology of humeral fractures in a sample of dairy heifers. *New Zealand veterinary journal*, 1-8.
32. Dou, C., Li, J., Kang, F., Cao, Z., Yang, X., Jiang, H., ... & Dong, S. (2016). Dual effect of cyanidin on RANK-induced differentiation and fusion of osteoclasts. *Journal of cellular physiology*, 231(3), 558-567.
33. Du, Y. F., Zhou, W. N., Hu, X., Wan, L. Z., & Chen, N. (2010). Establishment of experimental animal model of osteoporosis induced by ovariectomy in rats [J]. *Stomatology*, 7, 011.
34. EB Encyclopaedia Britannica (s.f.) Bone Images and Videos. Recuperado de: <https://www.britannica.com/science/bone-anatomy/images-videos> el 9 de Diciembre de 2016.
35. Ekiel, I., & Abrahamson, M. (1996). Folding-related dimerization of human cystatin C. *Journal of Biological Chemistry*, 271(3), 1314-1321.
36. Fang, J., & Hall, B. K. (1997). Chondrogenic cell differentiation from membrane bone periosteum. *Anatomy and embryology*, 196(5), 349-362.
37. Ferron, M., Wei, J., Yoshizawa, T., Del Fattore, A., DePinho, R. A., Teti, A., ... & Karsenty, G. (2010). Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. *Cell*, 142(2), 296-308.

38. Frattini, A., Orchard, P. J., Sobacchi, C., Giliani, S., Abinun, M., Mattsson, J. P., ... & Notarangelo, L. D. (2000). Defects in TCIRG1 subunit of the vacuolar proton pump are responsible for a subset of human autosomal recessive osteopetrosis. *Nature genetics*, 25(3), 343-346.
39. Garceau, V., Smith, J., Paton, I. R., Davey, M., Fares, M. A., Sester, D. P., ... & Hume, D. A. (2010). Pivotal Advance: Avian colony-stimulating factor 1 (CSF1), interleukin-34 (IL-34), and CSF1 receptor genes and gene products. *Journal of leukocyte biology*, 87(5), 753-764.
40. García-Morales, C. Por publicar.
41. Georgess, D., Mazzorana, M., Terrado, J., Delprat, C., Chamot, C., Guasch, R. M., ... & Machuca-Gayet, I. (2014). Comparative transcriptomics reveals RhoE as a novel regulator of actin dynamics in bone-resorbing osteoclasts. *Molecular biology of the cell*, 25(3), 380-396.
42. Gilbert, S. F. (2000). *Osteogenesis: the development of bones*. *Developmental biology*, 6.
43. Govindarajan, R., Duraiyan, J., Kaliyappan, K., & Palanisamy, M. (2012). *Microarray and its applications*. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences*, 4(6), 310.
44. Gowen, M., Lazner, F., Dodds, R., Kapadia, R., Feild, J., Tavaría, M., ... & Hertzog, P. (1999). Cathepsin K knockout mice develop osteopetrosis due to a deficit in matrix degradation but not demineralization. *Journal of Bone and Mineral Research*, 14(10), 1654-1663.
45. Grant, R. P. (Ed.). (2004). *Computational genomics: theory and application*. Cambridge: Horizon Bioscience.
46. Hadji, P., Klein, S., Gothe, H., Häussler, B., Kless, T., Schmidt, T., ... & Linder, R. (2013). The epidemiology of osteoporosis—Bone Evaluation Study (BEST). *Dtsch Arztebl Int*, 110(4), 52-57.
47. Hadjidakis, D. J., & Androulakis, I. I. (2006). Bone remodeling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1092(1), 385-396.
48. Hakeda, Y., & Kumegawa, M. (1991). Osteoclasts in bone metabolism. *Kaibogaku zasshi. Journal of anatomy*, 66(4), 215-225.
49. Halfon, S., Ford, J., Foster, J., Dowling, L., Lucian, L., Sterling, M., ... & Helms, A. (1998). Leukocystatin, a new class II cystatin expressed selectively by hematopoietic cells. *Journal of Biological Chemistry*, 273(26), 16400-16408.
50. Hamilton, J. A. (1997). CSF1 signal transduction. *Journal of leukocyte biology*, 62(2), 145-155.
51. Hawley, T. S., & Hawley, R. G. (Eds.). (2004). *Flow cytometry protocols (Vol. 263, pp. 345-354)*. New York: Humana Press.
52. Hayashi, S. I., Miyamoto, A., Yamane, T., Kataoka, H., Ogawa, M., Sugawara, S., ... & Kunisada, T. (1997). Osteoclast precursors in bone marrow and peritoneal cavity. *Journal of cellular physiology*, 170(3), 241-247.
53. Hayman, A. R. (2008). Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. *Autoimmunity*, 41(3), 218-223.
54. Hillier, L. W., Miller, W., Birney, E., Warren, W., Hardison, R. C., Ponting, C. P., ... & Dodgson, J. B. (2004). Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature*, 432(7018), 695-716.
55. Hovagimian, H., Molica, C., & Billiar, K. (2011, April). Osteoporotic equine bone modeling: 3-point bending of deer metacarpal bone. In *Bioengineering Conference (NEBEC), 2011 IEEE 37th Annual Northeast (pp. 1-2)*. IEEE.
56. Huang, D. W., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009). Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic acids research*, 37(1), 1-13.
57. Huang, F. J., & Li, K. Q. (2013). Research on the progress of cage layer osteoporosis [J]. *Sichuan Animal & Veterinary Sciences*, 5, 017.
58. Hume, D. A., & MacDonald, K. P. (2012). Therapeutic applications of macrophage colony-stimulating factor-1 (CSF1) and antagonists of CSF1 receptor (CSF1R) signaling. *Blood*, 119(8), 1810-1820.

59. IOF International Osteoporosis Foundation, (2012) Recuperado de: <https://www.iofbonehealth.org/sites/default/files/media/PDFs/Regional%20Audits/2012-Latin America Audit-Mexico-ES 0 0.pdf> el 15 de Febrero de 2017-02-15
60. Itzstein, C., Coxon, F. P., & Rogers, M. J. (2011). The regulation of osteoclast function and bone resorption by small GTPases. *Small GTPases*, 2(3), 117-130.
61. Jain, N., & Weinstein, R. S. (2009). Giant osteoclasts after long-term bisphosphonate therapy: diagnostic challenges. *Nature Reviews Rheumatology*, 5(6), 341-346.
62. Kamiya, N., Suzuki, H., Yano, M., Endo, T., Takano, M., Komaru, A., ... & Ichikawa, T. (2010). Implications of serum bone turnover markers in prostate cancer patients with bone metastasis. *Urology*, 75(6), 1446-1451.
63. Kiechl, S., Wittmann, J., Giaccari, A., Knoflach, M., Willeit, P., Bozec, A., ... & Summerer, M. (2013). Blockade of receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK) signaling improves hepatic insulin resistance and prevents development of diabetes mellitus. *Nature medicine*, 19(3), 358-363.
64. Kieslinger, M., Woldman, I., Moriggl, R., Hofmann, J., Marine, J.-C., Ihle, J. N., ... Decker, T. (2000). Antiapoptotic activity of Stat5 required during terminal stages of myeloid differentiation. *Genes & Development*, 14(2), 232-244.
65. Kim, H. M., Kim, Y. S., Woo, K. M., Park, S. J., Rey, C., Kim, Y., ... & Ko, J. S. (2001). Dissolution of poorly crystalline apatite crystals by osteoclasts determined on artificial thin-film apatite. *Journal of biomedical materials research*, 56(2), 250-256.
66. Kim, N., Kadono, Y., Takami, M., Lee, J., Lee, S. H., Okada, F., ... & Yeh, W. C. (2005). Osteoclast differentiation independent of the TRANCE-RANK-TRAF6 axis. *The Journal of experimental medicine*, 202(5), 589-595.
67. Krebsbach, P. H., Kuznetsov, S. A., Bianco, P., & Gehron Robey, P. (1999). Bone marrow stromal cells: characterization and clinical application. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 10(2), 165-181.
68. Krook, L., Lutwak, L., Henrikson, P. Å., Kallfelz, F., Hirsch, C., Romanus, B., ... & Sheffy, B. E. (1971). Reversibility of nutritional osteoporosis: physicochemical data on bones from an experimental study in dogs. *The Journal of nutrition*, 101(2), 233-246.
69. Kubatzky, K. F., Kloos, B., & Hildebrand, D. (2013). Signaling cascades of Pasteurella multocida toxin in immune evasion. *Toxins*, 5(9), 1664-1681.
70. Lacey, D. L., Timms, E., Tan, H. L., Kelley, M. J., Dunstan, C. R., Burgess, T., ... & Hsu, H. (1998). Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *cell*, 93(2), 165-176.
71. Lee, N. K. (2010). Molecular understanding of osteoclast differentiation and physiology. *Endocrinology and Metabolism*, 25(4), 264-269.
72. Lee, S. H., Rho, J., Jeong, D., Sul, J. Y., Kim, T., Kim, N., ... & Pignolo, R. J. (2006). v-ATPase VO subunit d2-deficient mice exhibit impaired osteoclast fusion and increased bone formation. *Nature medicine*, 12(12), 1403-1409.
73. Lewin, B., & Dover, G. (1994). *Genes v* (Vol. 1110). Oxford: Oxford University Press.
74. Linder, Stefan, and Martin Aepfelbacher. "Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells." *Trends in cell biology* 13.7 (2003): 376-385.
75. Lotinun, S., Kiviranta, R., Matsubara, T., Alzate, J. A., Neff, L., Lüth, A., ... & Horne, W. C. (2013). Osteoclast-specific cathepsin K deletion stimulates S1P-dependent bone formation. *The Journal of clinical investigation*, 123(2), 666-681.
76. Lovato-Salas, F., Luna-Pizarro, D., Oliva-Ramírez, S. A., Flores-Lujano, J., & Núñez-Enríquez, J. C. (2015). Prevalencia de fracturas de cadera, fémur y rodilla en la Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Traumatología y Ortopedia " Lomas Verdes" del Instituto Mexicano del Seguro Social. *Acta ortopédica mexicana*, 29(1), 13-20.

77. Makridis, K. G., Karachalios, T., Kontogeorgakos, V. A., Badras, L. S., & Malizos, K. N. (2015). The effect of osteoporotic treatment on the functional outcome, re-fracture rate, quality of life and mortality in patients with hip fractures: a prospective functional and clinical outcome study on 520 patients. *Injury*, 46(2), 378-383.
78. Mansky, K. C., Sankar, U., Han, J., & Ostrowski, M. C. (2002). Microphthalmia transcription factor is a target of the p38 MAPK pathway in response to receptor activator of NF- κ B ligand signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 277(13), 11077-11083.
79. Mao, Y., Huang, X., Zhao, J., & Gu, Z. (2011). Preliminary identification of potential PDZ-domain proteins downstream of ephrin B2 during osteoclast differentiation of RAW264. 7 cells. *International journal of molecular medicine*, 27(5), 669-677.
80. Marino, S., Logan, J. G., Mellis, D., & Capulli, M. (2014). Generation and culture of osteoclasts. *BoneKEY reports*, 3.
81. MARKS, S. C., & LANE, P. W. (1976). Osteopetrosis, a new recessive skeletal mutation on chromosome 12 of the mouse. *Journal of Heredity*, 67(1), 11-18.
82. Marosy, B., Justice, C. M., Vu, C., Zorn, A., Nzegwu, N., Wilson, A. F., & Miller, N. H. (2010). Identification of Susceptibility Loci for Scoliosis in FIS Families with Triple Curves. *American Journal of Medical Genetics. Part a*, 152A(4), 846-855. <http://doi.org/10.1002/ajmg.a.33222>
83. Matsuo, K., Owens, J. M., Tonko, M., Elliott, C., Chambers, T. J., & Wagner, E. F. (2000). Fos1 is a transcriptional target of c-Fos during osteoclast differentiation. *Nature genetics*, 24(2), 184-187.
84. Menke, J., Rabacal, W. A., Byrne, K. T., Iwata, Y., Schwartz, M. M., Stanley, E. R., ... & Kelley, V. R. (2009). Circulating CSF1 promotes monocyte and macrophage phenotypes that enhance lupus nephritis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(12), 2581-2592.
85. Merico, D., Gfeller, D., & Bader, G. D. (2009). How to visually interpret biological data using networks. *Nature biotechnology*, 27(10), 921.
86. Michael, H., Härkönen, P. L., Väänänen, H. K., & Hentunen, T. A. (2005). Estrogen and testosterone use different cellular pathways to inhibit osteoclastogenesis and bone resorption. *Journal of Bone and Mineral Research*, 20(12), 2224-2232.
87. Miyamoto, T. (2013). STATs and macrophage fusion. *Jak-Stat*, 2(3), e24777.
88. Mizuno, Y., Hosoi, T., Inoue, S., Ikegami, A., Kaneki, M., Akedo, Y., ... & Orimo, H. (1994). Immunocytochemical identification of androgen receptor in mouse osteoclast-like multinucleated cells. *Calcified tissue international*, 54(4), 325-326.
89. Mok, S., Koya, R. C., Tsui, C., Xu, J., Robert, L., Wu, L., ... & Ribas, A. (2014). Inhibition of CSF1 receptor improves the antitumor efficacy of adoptive cell transfer immunotherapy. *Cancer research*, 74(1), 153-161.
90. Moore, K. J., & Tabas, I. (2011). Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell*, 145(3), 341-355.
91. Mouchemore, K. A., & Pixley, F. J. (2012). CSF1 signaling in macrophages: pleiotrophy through phosphotyrosine-based signaling pathways. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 49(2), 49-61.
92. Mukherjee, S., & Roberts, S. J. (2004, August). A theoretical analysis of gene selection. In *Computational Systems Bioinformatics Conference, 2004. CSB 2004. Proceedings. 2004 IEEE* (pp. 131-141). IEEE.
93. Murray, R. K. (2009). Harper's illustrated biochemistry. New York: McGraw-Hill Medical; London: McGraw-Hill [distributor].
94. Nakagawa, M., Kaneda, T., Arakawa, T., Morita, S., Sato, T., Yomada, T., ... & Hakeda, Y. (2000). Vascular endothelial growth factor (VEGF) directly enhances osteoclastic bone resorption and survival of mature osteoclasts. *FEBS letters*, 473(2), 161-164.
95. Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R., & de Crombrughe, B. (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 108(1), 17-29.

96. Niida, S., Kaku, M., Amano, H., Yoshida, H., Kataoka, H., Nishikawa, S., ... & Kodama, H. (1999). Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. *Journal of Experimental Medicine*, 190(2), 293-298.
97. Park, S. H., Cho, M. L., Park, M. K., Kwok, S. K., Lee, J., Park, J. S., ... & Park, E. M. (2014). U.S. Patent Application No. 14/917,548.
98. Pavlopoulos, G. A., Wegener, A. L., & Schneider, R. (2008). A survey of visualization tools for biological network analysis. *Biodata mining*, 1(1), 12.
99. Piper, K., Boyde, A., & Jones, S. J. (1992). The relationship between the number of nuclei of an osteoclast and its resorptive capability in vitro. *Anatomy and embryology*, 186(4), 291-299.
100. Pisani, P., Renna, M. D., Conversano, F., Casciaro, E., Di Paola, M., Quarta, E., ... & Casciaro, S. (2016). Major osteoporotic fragility fractures: Risk factor updates and societal impact. *World journal of orthopedics*, 7(3), 171.
101. Pixley, F. J., & Stanley, E. R. (2004). CSF1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. *Trends in cell biology*, 14(11), 628-638.
102. Prabakaran, S. (2016). CSF1 delivers a painful signal. *Sci. Signal.*, 9(410), ec6-ec6.
103. Reinholt, F. P., Hulthén, K., Oldberg, A., & Heinegård, D. (1990). Osteopontin—a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12), 4473-4475.
104. Reyes-García, R., Rozas-Moreno, P., López-Gallardo, G., García-Martín, A., Varsavsky, M., Avilés-Perez, M. D., & Muñoz-Torres, M. (2013). Serum levels of bone resorption markers are decreased in patients with type 2 diabetes. *Acta diabetologica*, 50(1), 47-52.
105. Rinotas, V., Niti, A., Dacquin, R., Bonnet, N., Stolina, M., Han, C. Y., ... & Douni, E. (2014). Novel genetic models of osteoporosis by overexpression of human RANK in transgenic mice. *Journal of Bone and Mineral Research*, 29(5), 1158-1169.
106. Rix, M., Andreassen, H., Eskildsen, P., Langdahl, B., & Olgaard, K. (1999). Bone mineral density and biochemical markers of bone turnover in patients with predialysis chronic renal failure. *Kidney international*, 56(3), 1084-1093.
107. Rory A. Fisher, *RGS Protein Physiology and Pathophysiology, Volumen 133 de Progress in Molecular Biology and Translational Science Academic Press, 2015 226 pp.*
108. Saltel, F., Destaing, O., Bard, F., Eichert, D., & Jurdic, P. (2004). Apatite-mediated actin dynamics in resorbing osteoclasts. *Molecular biology of the cell*, 15(12), 5231-5241.
109. Scheschonka A1, Dessauer CW, Sinnarajah S, Chidiac P, Shi CS, Kehrl JH. RGS3 is a GTPase-activating protein for g(ialpha) and g(qalpha) and a potent inhibitor of signaling by GTPase-deficient forms of g(qalpha) and g(11alpha). *Mol Pharmacol*. 2000 Oct;58(4):719-28.
110. Schindeler, A., McDonald, M. M., Bokko, P., & Little, D. G. (2008, October). Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 19, No. 5, pp. 459-466). Academic Press.
111. Schulze, J., Bickert, T., Beil, F. T., Zaiss, M. M., Albers, J., Wintges, K., ... & Spiro, A. S. (2011). Interleukin-33 is expressed in differentiated osteoblasts and blocks osteoclast formation from bone marrow precursor cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, 26(4), 704-717.
112. Schüttelkopf, A. W., Hamilton, G., Watts, C., & van Aalten, D. M. (2006). Structural basis of reduction-dependent activation of human cystatin F. *Journal of Biological Chemistry*, 281(24), 16570-16575.
113. Shapiro, F. (2008). Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Eur Cell Mater*, 15(53), e76.
114. Sharma, S. M., Bronisz, A., Hu, R., Patel, K., Mansky, K. C., Sif, S., & Ostrowski, M. C. (2007). MITF and PU. 1 recruit p38 MAPK and NFATc1 to target genes during osteoclast differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(21), 15921-15929.

115. Sherr, C. J., Rettenmier, C. W., Sacca, R., Roussef, M. F., Look, A. T., & Stanley, E. R. (1985). The *c-fms* proto-oncogene product is related to the receptor for the mononuclear phagocyte growth factor, CSF 1. *Cell*, 41(3), 665-676.
116. Sigl, V., & Penninger, J. M. (2014). RANK/RANKL—from bone physiology to breast cancer. *Cytokine & growth factor reviews*, 25(2), 205-214.
117. Singh, P. P., van der Kraan, A. G. J., Xu, J., Gillespie, M. T., & Quinn, J. M. (2012). Membrane-bound receptor activator of NF- κ B ligand (RANK) activity displayed by osteoblasts is differentially regulated by osteolytic factors. *Biochemical and biophysical research communications*, 422(1), 48-53.
118. Sobacchi, C., Schulz, A., Coxon, F. P., Villa, A., & Helfrich, M. H. (2013). Osteopetrosis: genetics, treatment and new insights into osteoclast function. *Nature Reviews Endocrinology*, 9(9), 522-536.
119. Stanley, E. R., Chen, D. M., & Lin, H. S. (1978). Induction of macrophage production and proliferation by a purified colony stimulating factor. *Nature*, 274(5667), 168-170.
120. Stark, Z., & Savarirayan, R. (2009). Osteopetrosis. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 4(1), 5.
121. Stein, L. (2001). *Genome annotation: from sequence to biology*. *Nature reviews genetics*, 2(7), 493-503.
122. Stern, C. D. (2005). The chick: a great model system becomes even greater. *Developmental cell*, 8(1), 9-17.
123. Sutton, K. M., Hu, T., Wu, Z., Siklodi, B., Vervelde, L., & Kaiser, P. (2015). The functions of the avian receptor activator of NF- κ B ligand (RANK) and its receptors, RANK and osteoprotegerin, are evolutionarily conserved. *Developmental & Comparative Immunology*, 51(1), 170-184.
124. Szekanecz, Z., & Koch, A. E. (2007). Macrophages and their products in rheumatoid arthritis. *Current opinion in rheumatology*, 19(3), 289-295.
125. Takahashi, N., Akatsu, T., Udagawa, N., Sasaki, T., Yamaguchi, A., Moseley, J. M., ... & Suda, T. (1988). Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology*, 123(5), 2600-2602. B
126. Takahashi, N., Yamana, H., Yoshiki, S., Roodman, G. D., Mundy, G. R., Jones, S. J., ... & Suda, T. (1988). Osteoclast-Like Cell Formation and its Regulation by Osteotropic Hormones in Mouse Bone Marrow Cultures*. *Endocrinology*, 122(4), 1373-1382. A
127. Teichmann, J., Lange, U., Stracke, H., Federlin, K., & Bretzel, R. G. (1999). Bone metabolism and bone mineral density of systemic lupus erythematosus at the time of diagnosis. *Rheumatology international*, 18(4), 137-140.
128. Teitelbaum, S. L. (2000). Bone resorption by osteoclasts. *Science*, 289(5484), 1504-1508.
129. Teitelbaum, S. L., & Ross, F. P. (2003). Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nature Reviews Genetics*, 4(8), 638-649.
130. Thermo Scientific, *Texas Red™-X Phalloidin Product Overview (s.f)*, recuperado el 17 de Agosto de 2017 de: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/T7471>
131. Tiedemann, K., Le Nihouannen, D., Fong, J. E., Hussein, O., Barralet, J. E., & Komarova, S. V. (2017). Regulation of Osteoclast Growth and Fusion by mTOR/raptor and mTOR/riCTOR/Akt. *Frontiers in cell and developmental biology*, 5.
132. Tolba, M. F., El-Serafi, A. T., & Omar, H. A. (2017). Caffeic acid phenethyl ester protects against glucocorticoid-induced osteoporosis in vivo: Impact on oxidative stress and RANK/OPG signals. *Toxicology and Applied Pharmacology*.
133. Turner, A. G., Tjahjono, F., Chiu, W. M., Skinner, J., Sawyer, R., Moore, A. J., ... & Davey, R. A. (2011). The role of the calcitonin receptor in protecting against induced hypercalcemia is mediated via its actions in osteoclasts to inhibit bone resorption. *Bone*, 48(2), 354-361.
134. Turner, A. S. (2002). The sheep as a model for osteoporosis in humans. *The Veterinary Journal*, 163(3), 232-239.

135. Udagawa, N., Takahashi, N., Akatsu, T., Sasaki, T., Yamaguchi, A., Kodama, H., ... & Suda, T. (1989). The bone marrow-derived stromal cell lines MC3T3-G2/PA6 and ST2 support osteoclast-like cell differentiation in cocultures with mouse spleen cells. *Endocrinology*, 125(4), 1805-1813.
136. UNA, Unión Nacional de Avicultores, Indicadores Económicos del Sector Avícola (2016) Recuperado de: <http://www.una.org.mx/index.php/component/content/article/2-uncategorised/19-indicadores-economicos> el 9 de Febrero de 2017.
137. UNISA, University of South Australia (2012), *Laser Desorption Mass Spectrometry on Porous Silicon*. Recuperado de: <http://www.unisa.edu.au/Research/research-archive/Mawson-Institute/Research/Key-Research-Projects/Voelcker/Laser-Desorption-Mass-Spectrometry-on-Porous-Silicon/> el 9 de Diciembre de 2016.
138. Van der Geyten, S., Sanders, J. P., Kaptein, E., Darras, V. M., Kühn, E. R., Leonard, J. L., & Visser, T. J. (1997). Expression of chicken hepatic type I and type III iodothyronine deiodinases during embryonic development. *Endocrinology*, 138(12), 5144-5152.
139. Warden, S. J., & Haney, E. M. (2008). Skeletal effects of serotonin (5-hydroxytryptamine) transporter inhibition: evidence from in vitro and animal-based studies. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*, 8(2), 121-132.
140. Webster, A. B. (2004). Welfare implications of avian osteoporosis. *Poultry Science*, 83(2), 184-192.
141. Williams, A. J., Robson, H., Kester, M. H., Van Leeuwen, J. P., Shalet, S. M., Visser, T. J., & Williams, G. R. (2008). Iodothyronine deiodinase enzyme activities in bone. *Bone*, 43(1), 126-134.
142. Williams, G. R., & Bassett, J. D. (2011). Local control of thyroid hormone action: role of type 2 deiodinase Deiodinases: the balance of thyroid hormone. *Journal of Endocrinology*, 209(3), 261-272.
143. Wimsatt, J., Dressen, P., Dennison, C., & Simon Turner, A. (2000). Ultrasound therapy for the prevention and correction of contractures and bone mineral loss associated with wing bandaging in the domestic pigeon (*Columba livia*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 31(2), 190-195.
144. Xia, W., Hilgenbrink, A. R., Matteson, E. L., Lockwood, M. B., Cheng, J. X., & Low, P. S. (2009). A functional folate receptor is induced during macrophage activation and can be used to target drugs to activated macrophages. *Blood*, 113(2), 438-446.
145. Xu, F., & Teitelbaum, S. L. (2013). Osteoclasts: new insights. *Bone research*, 1(1), 11.
146. Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., ... & Chen, H. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*, 112(12), 1821-1830.
147. Yagi, M., Miyamoto, T., Sawatani, Y., Iwamoto, K., Hosogane, N., Fujita, N., ... & Oike, Y. (2005). DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. *Journal of Experimental Medicine*, 202(3), 345-351.
148. Yamaza, T., Tsuji, Y., Goto, T., Kido, M. A., Nishijima, K., Moroi, R., ... & Tanaka, T. (2001). Comparison in localization between cystatin C and cathepsin K in osteoclasts and other cells in mouse tibia epiphysis by immunolight and immunoelectron microscopy. *Bone*, 29(1), 42-53.
149. Yang, D. Q., Feng, S., Chen, W., Zhao, H., Paulson, C., & Li, Y. P. (2012). V-ATPase subunit ATP6AP1 (Ac45) regulates osteoclast differentiation, extracellular acidification, lysosomal trafficking, and protease exocytosis in osteoclast-mediated bone resorption. *Journal of Bone and Mineral Research*, 27(8), 1695-1707.
150. Yang, K., Cai, Z., Li, J., & Lin, G. (2006). A stable gene selection in microarray data analysis. *BMC bioinformatics*, 7(1), 228.
151. Yang, M., Birnbaum, M. J., MacKay, C. A., Mason-Savas, A., Thompson, B., & Odgren, P. R. (2008). Osteoclast stimulatory transmembrane protein (OC-STAMP), a novel protein induced by RANK that promotes osteoclast differentiation. *Journal of cellular physiology*, 215(2), 497-505.

152. Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S. I., ... & Tsuda, E. (1998). *Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANK*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(7), 3597-3602.
153. Young, M. F. (2003). Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis. *Osteoporosis international*, 14(3), 35-42.
154. Yu, L. Z., Wang, Y., Zhang, S. C., & Zhou, J. (2010). *Research Progress on Osteoporosis Disease of Beef Cattle Fed in Greenhouse*. *China Cattle Science*, 6, 014.
155. Yuan, F. L., Xu, M. H., Li, X., Xinlong, H., Fang, W., & Dong, J. (2016). *The roles of acidosis in osteoclast biology*. *Frontiers in physiology*, 7.
156. Yuiko TOHMA, Masato KAKU, Masahide MOTOKAWA, Yuyu LIN, Hiroko KAMATA, Masako TAI, Natsumi TSUKA, Hiroyuki KOSEKI, Junji OHTANI, Tadashi FUJITA, Toshitsugu KAWATA, and Kazuo TANNE (2008) *VEGF induces osteoclast differentiation via FLT-1 and FLK-1*. *Biomedical Research*; 19 (3):145-150
157. Zou, W., & Teitelbaum, S. L. (2010). *Integrins, growth factors, and the osteoclast cytoskeleton*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1192(1), 27-31.