

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE DERMATOLOGÍA, ESTOMATOLOGÍA, RADIOLOGÍA Y MEDICINA FÍSICA

ACCIÓN DE LA MELATONINA SOBRE LAS CÉLULAS MADRE HUMANAS EN LA DIFERENCIACIÓN OSTEOBLÁSTICA. ESTUDIO EXPERIMENTAL IN VITRO

Cristina Pérez Sánchez

2012

"A la persona que, sin estar presente, siempre me acompaña y cuida de mi,

dándome toda la fuerza necesaria para conseguir logros

y superar dificultades... mi padre"

AGRADECIMIENTOS

-Al profesor José Luis Calvo Guirado, por su ayuda incondicional, porque sin su apoyo, sus ganas y su entusiasmo la realización de esta tesis doctoral no habría sido posible.

-Al doctor Luis Meseguer Olmo, por haberme enseñado el estudio y cultivo de las células madre.

-Al doctor Francisco García Gómez, por brindarme la oportunidad de aprender a investigar.

-Al doctor Javier Guardia, por mostrarse siempre dispuesto a ayudar.

-A Ana Lucas, Irene Páez, Ángela Perona, Patricia Guerao y Andrea Belmonte por concederme tantos buenos momentos a lo largo de mi vida.

-A Javier García, por ser mi apoyo constante.

-A Ana Martínez, compañera y gran amiga, por su amistad y comprensión en los momentos más difíciles, así como al resto de mis compañeros de doctorado Antonio Aguilar-Salvatierra, Carlos Pérez y María Ramos.

-A Francesca y todos mis compañeros de laboratorio, por su colaboración y compañerismo desinteresado.

-A Antonia Bernabeu del Servicio de Apoyo a la Investigación, por su gran ayuda en la planificación y desarrollo del estudio de esta tesis.

-A los doctores Piedad, Pepe y Rafa, muchas gracias por vuestra colaboración.

-A mi familia, mi madre, mis hermanos, mis sobrinos y mis padrinos.

ABREVIATURAS

- ✓ ADNc: ADN complementario.
- ✓ aFMK: N^1 -acetil- N^2 -formil-5-metoxiquinurenamina.
- ✓ ALP: Fosfatasa alcalina.
- ✓ AMPc: Adenosín monofosfato cíclico.
- ✓ APC: Aloficocianina.
- ✓ ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.
- ✓ ATP: Adenosintrifosfato.
- ✓ BMPs: Proteínas morfogenéticas óseas.
- ✓ BSP: sialoproteína ósea.
- ✓ CD: Cluster of differentiation.
- ✓ CFU-F: Colonias de aspecto fibroblástico.
- ✓ CMM: Célula madre mesenquimal.
- ✓ CMM-*ah*: Célula madre mesenquimal adulta humana.
- ✓ CPI: Índice periodontal comunitario.
- ✓ DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium.
- ✓ DMSO: Dimetil sulfóxido.
- ✓ FBS: Suero fetal bovino.
- ✓ FGF-2: Factor de crecimiento fibroblástico 2.
- ✓ FITC: Isocianato de fluoresceína.
- ✓ GM-CFU: Unidades formadoras de colonias de granulocitos-macrófagos.
- ✓ GMPc: Guanosín monofosfato cíclico.
- ✓ H₂O₂: Peróxido de hidrógeno.
- ✓ HO•: Radical hidroxilo.
- ✓ IFN-γ: Interferón γ.
- ✓ IGF: Factor de crecimiento semejante a insulina.
- ✓ IL: Interleuquina.
- ✓ ISCT: Sociedad Internacional de Terapia Celular.
- ✓ L-RANK: Ligando de unión al receptor activador del factor nuclear κΒ.
- ✓ MC: Medio de crecimiento.

- ✓ M-CSF: Factor estimulador de colonias de macrófagos.
- ✓ MEB: Microscopio electrónico de barrido.
- ✓ MO: Medio osteogénico.
- ✓ MTT: Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol.
- ✓ NO•: Óxido nítrico.
- ✓ O_2^- •: Anión superóxido.
- ✓ OCT-4: Octamer Binding Protein 4.
- ✓ ONOO⁻: Peroxinitritos.
- ✓ PBS: Tampón fosfato salino.
- ✓ PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.
- ✓ PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas.
- ✓ PE: Ficoeritrina.
- ✓ P-NPP: p-nitrofenil fosfato.
- ✓ PTH: Parathormona.
- ✓ RGD: Arg-Gly-Asp.
- ✓ ROO•: Radical peroxilo.
- ✓ ROS: Reactive Oxygen Species.
- ✓ SD: Standard Deviation.
- **✓** TGF-β: Factor de crecimiento transformante β.
- ✓ TNF-α: Factor de necrosis tumoral α.
- ✓ TRAP: Fosfatasa ácida resistente a tartrato.
- ✓ α -MEM: α -Minimum Essential Medium.

ÍNDICE

| 1. | Antecedentes y justificación1 |
|----|--|
| 2. | Introducción6 |
| | 2. 1. Fisiología ósea7 |
| | 2. 1. 1. Osteoblastos y osteocitos9 |
| | 2. 1. 2. Osteoclastos11 |
| | 2. 1.2.1. Mecanismos de reabsorción ósea |
| | 2. 1. 2. 2. Radicales libres y reabsorción ósea14 |
| | 2. 2. Células madre procedentes de la médula ósea15 |
| | 2. 2. 1. Concepto, antecedentes y tipos celulares15 |
| | 2. 2. 2. Célula madre mesenquimal16 |
| | 2. 2. 2. 1. Definición y morfología16 |
| | 2. 2. 2. 2. Diferenciación a osteoblasto18 |
| | 2. 2. 2. 3. Diferenciación a adipocito19 |
| | 2. 2. 2. 4. Diferenciación a condrocito19 |
| | 2. 2. 2. 5. Potencial terapéutico de las células madre mesenquimales19 |
| | 2. 3. Melatonina20 |
| | 2. 3. 1. Definición, historia y biosíntesis20 |
| | 2. 3. 2. Ritmos circadianos27 |
| | 2. 3. 3. Propiedades |
| | 2. 3. 3. 1. Antioxidante y depurador de radicales libres |
| | 2. 3. 3. 2. Inmunomodulador31 |
| | 2. 3. 3. 3. Estimulador de la formación ósea32 |
| | 2. 3. 3. 4. Melatonina en procesos cancerígenos37 |
| | 2. 3. 3. 5. Hormona del sueño |
| | 2. 3. 3. 6. Melatonina y jet-lag |
| | 2. 3. 3. 7. Antidepresiva |
| | 2. 3. 3. 8. Estimuladora de la sexualidad39 |
| | 2. 3. 3. 9. Melatonina y cavidad oral40 |

| 3. | Objetivos | .43 |
|----|---|------|
| 4. | Material y métodos | .45 |
| | 4. 1. Aislamiento y cultivo de células madre mesenquimales | 46 |
| | 4. 2. Identificación de las células aisladas | 48 |
| | 4. 3. Diseño experimental del estudio | 50 |
| | 4. 3. 1. Ensayo de proliferación celular | 53 |
| | 4. 3. 2. Observaciones con microscopía óptica de contraste de fases | 55 |
| | 4. 3. 3. Estudio ultraestructural mediante microscopía electrónica de barrido | 56 |
| | 4. 3. 4. Microanálisis espectroscópico | 57 |
| | 4. 3. 5. Citometría de flujo | 57 |
| | 4. 3. 6. Determinación de la producción de fosfatasa alcalina | 57 |
| | 4. 3. 7. Determinación de osteogénesis | 60 |
| | 4. 3. 8. PCR clásica y PCR cuantitativa | 61 |
| | 4. 3. 9. Análisis estadístico | 64 |
| 5. | Resultados | .66 |
| | 5. 1. Aislamiento y cultivo de células madre mesenquimales | 67 |
| | 5. 2. Identificación de las células aisladas | 68 |
| | 5. 3. Ensayo de proliferación celular | 70 |
| | 5. 4. Observaciones con microscopía óptica de contraste de fases | 74 |
| | 5. 5. Estudio ultraestructural mediante microscopía electrónica de barrido | 87 |
| | 5. 6. Microanálisis espectroscópico | 92 |
| | 5. 7. Citometría de flujo | 93 |
| | 5. 8. Determinación de la producción de fosfatasa alcalina | 96 |
| | 5. 9. Determinación de osteogénesis | 98 |
| | 5. 10. PCR clásica y PCR cuantitativa | .104 |
| 6 | . Discusión1 | .09 |
| 7 | . Conclusiones1 | 21 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| -Fig 1. Tejido óseo en el que se observan numerosos osteoblastos | 9 |
|---|-------------|
| -Fig 2. Osteoclasto | 12 |
| -Fig 3. Esquema del mecanismo de reabsorción ósea | 13 |
| -Fig 4. Células madre mesenquimales. (Microscopio óptico, 20X) | 17 |
| -Fig 5. Depósitos de calcio en cultivo en medio osteogénico. (Microscopio óptico, 10X) | 18 |
| -Fig 6. Corte sagital del cerebro | 21 |
| -Fig 7. Biosíntesis de la melatonina a partir del triptófano | 23 |
| -Fig 8. Principales mecanismos de acción de la melatonina | 24 |
| -Fig 9. Vía nerviosa de la regulación de la síntesis de melatonina | 28 |
| -Fig 10. Mecanismo de neutralización de un radical hidroxilo y un radical anión superóxido la melatonina | o por 30 |
| -Fig 11. Incubador Steri-Cult 200 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EEUU) | 47 |
| -Fig 12. Esquema ilustrativo del funcionamiento de un citómetro | 48 |
| -Fig 13. Citómetro de flujo modelo FACSort (Becton Dickinson) | 50 |
| -Fig 14. Componentes del medio osteogénico (Sigma-Aldrich [™]) | 51 |
| -Fig 15. Polvo de Melatonina (Sigma-Aldrich [™]) | 51 |
| -Fig 16. Distribución de los pocillos en el ensayo del MTT | 54 |
| -Fig 17. Microscopio óptico de contraste de fases (Nikon modelo Eclipse TE2000 U) | 55 |
| -Fig 18. Imagen de microscopio electrónico de barrido modelo JSM-6100 (Jeol) | 56 |
| -Fig 19. Kit cuantitativo de fosfatasa alcalina (Millipore, Billerica, MA, EEUU) | 58 |
| -Fig 20. Imagen que muestra la curva estándar | 59 |
| -Fig 21. Espectrofotómetro FLUOstar Galaxy (BMG Labtech) | 59 |
| -Fig 22. Imagen que muestra el kit de osteogénesis (Millipore) | 60 |
| -Fig 23. Termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen) | 63 |
| -Fig 24 A. Células madre hematopoyéticas y CMM-ah a los 3 días de cultivo (10X) | 67 |
| -Fig 24 B. Células madre hematopoyéticas y CMM-ah a los 7 días de cultivo (10X) | 67 |
| -Fig 25 A. Imagen del cultivo a los 7 días una vez renovado el medio (10X) | 68 |
| -Fig 25 B. Cultivo confluente, en este punto fue cuando se realizó el subcultivo (10X) | 68 |
| -Fig 26 A. Imagen de la población estudiada | 69 |
| -Fig 26 B. Las células fueron positivas para CD105 | 69 |
| -Fig 27 A. Las células fueron positivas para el marcador CD73 | 69 |

| -Fig 27 B. Las células fueron positivas para el marcador CD90 | 69 |
|--|----|
| -Fig 28. Imagen de la población estudiada | 70 |
| -Fig 29 A. Las células fueron negativas para el marcador CD45 | 70 |
| -Fig 29 B. Las células fueron negativas para el marcador CD34 | 70 |
| -Fig 30. Cultivo control a los 3 días (20X) | 74 |
| -Fig 31. Colonias o agregados celulares compuestos por 25-40 células de media (10X) | 74 |
| -Fig 32. Cultivo control a los 14 días (10X) | 75 |
| -Fig 33. A los 21 días, las células formaron una imagen como de tapiz (10X) | 75 |
| -Fig 34. Cultivo con melatonina 0.01 μ M a los 3 días (20X) | 76 |
| -Fig 35. Cultivo con melatonina 0.01 μ M a los 7 días (10X) | 76 |
| -Fig 36. Cultivo con melatonina 0.01 μ M a los 14 días (10X) | 77 |
| -Fig 37. Cultivo con melatonina 0.01 μ M a los 21 días (10X) | 77 |
| -Fig 38. Cultivo con melatonina 50 μM a los 3 días (10X) | 78 |
| -Fig 39. Cultivo con melatonina 50 μM a los 7 días (10X) | 78 |
| -Fig 40. Cultivo con melatonina 50 μM a los 14 días (10X) | 79 |
| -Fig 41. Cultivo con melatonina 50 μM a los 21 días (20X) | 79 |
| -Fig 42. Cultivo con melatonina 100 μM a los 3 días (20X) | 80 |
| -Fig 43. Cultivo con melatonina 100 μM a los 7 días (10X) | 80 |
| -Fig 44. Cultivo con melatonina 100 μM a los 14 días (10X) | 81 |
| -Fig 45. Cultivo con melatonina 100 μM a los 21 días (10X) | 81 |
| -Fig 46. Nódulo refringente en el cultivo con melatonina 100 μ M a los 21 días | 82 |
| -Fig 47. Cultivo con melatonina 150 μM a los 3 días (20X) | 82 |
| -Fig 48. Cultivo con melatonina 150 μM a los 7 días (20X) | 83 |
| -Fig 49. Cultivo con melatonina 150 μM a los 21 días (10X) | 83 |
| -Fig 50. Cultivo con melatonina 150 μM a los 21 días (10X) | 84 |
| -Fig 51. Cultivo con dexametasona a los 3 días (20X) | 84 |
| -Fig 52. Cultivo con dexametasona a los 7 días (20X) | 85 |
| -Fig 53. Cultivo con dexametasona a los 14 días (10X) | 85 |
| -Fig 54. Cultivo con dexametasona a los 21 días (10X) | 86 |
| -Fig 55. Nódulo refringente en el cultivo tratado con dexametasona a los 21 días (10X) | 86 |
| -Fig 56. CMM- <i>ah</i> alargadas y separadas unas de las otras | 87 |
| -Fig 57. CMM-ah del cultivo control a los 7 días | 88 |
| -Fig 58. CMM-ah fusiformes y con filopodios a los 14 días en cultivo control | 88 |
| | |

| -Fig 59. Imagen donde se observa un cultivo confluente89 |
|---|
| -Fig 60. CMM- <i>ah</i> en cultivo con melatonina a los 3 días89 |
| -Fig 61. CMM- <i>ah</i> en cultivo con melatonina a los 7 días90 |
| -Fig 62. CMM- <i>ah</i> en cultivo con melatonina a los 14 días90 |
| -Fig 63. Morfología que adquirieron las CMM-ah a los 21 días de cultivo con melatonina91 |
| -Fig 64. Nódulo birrefringente encontrado en cultivo con dexametasona a los 21 días91 |
| -Fig 65. Nódulo birrefringente y su espectro de composición elemental92 |
| -Fig 66. Cultivo control rojo alizarina negativo99 |
| -Fig 67. Cultivo con melatonina 0.01 μM a los 21 días (10X)99 |
| -Fig 68. Cultivo con melatonina 50 μM a los 21 días (10X)100 |
| -Fig 69. CMM- ah expuestas a melatonina 100 μ M durante 21 días |
| -Fig 70. Gran intensidad de tinción en el cultivo con melatonina 150 μ M a los 21 días (10X)101 |
| -Fig 71. Vista más detallada (20X) de un cultivo con dexametasona a los 21 días101 |
| -Fig 72. Tinción obtenida en el cultivo con melatonina 0.01 μ M tras 28 días de cultivo (10X).102 |
| -Fig 73. Cultivo con melatonina 50 μM (20X)102 |
| -Fig 74. Cultivo con melatonina 100 μM tras 28 días de incubación (10X)103 |
| -Fig 75. Cultivo con melatonina 150 μM |
| -Fig 76. Cultivo con dexametasona tras 28 días de incubación (10X)104 |
| -Fig 77. Producto de la PCR que muestra la presencia del gen de la β-actina en las muestras de estudio105 |

ÍNDICE DE TABLAS

| -Tabla 1. Principales proteínas constituyentes de la matriz ósea | 7 |
|--|----|
| -Tabla 2. Grupos de estudio | 50 |
| -Tabla 3. Genes utilizados en la PCR-cuantitativa | 64 |
| -Tabla 4. Absorbancia en los diferentes cultivos con 1000 células/pocillo | 71 |
| -Tabla 5. Absorbancia en los diferentes cultivos con 1500 células/pocillo | 72 |
| -Tabla 6. Absorbancia en los diferentes cultivos con 2000 células/pocillo | 73 |
| -Tabla 7. Test de Wilcoxon en la prueba de la producción de fosfatasa alcalina | 97 |

ÍNDICE DE GRÁFICOS

| -Gráfico 1. Evolución de los diferentes cultivos a densidad 1000 células/pocillo a lo largo del tiempo72 |
|---|
| -Gráfico 2. Evolución de los diferentes cultivos a densidad 1500 células/pocillo a lo largo del tiempo72 |
| -Gráfico 3. Evolución de los diferentes cultivos a densidad 2000 células/pocillo a lo largo del tiempo73 |
| -Gráfico 4. Evolución de la expresión del marcador CD105 en los diferentes grupos de estudio y a lo largo del tiempo94 |
| -Gráfico 5. Evolución de la expresión del marcador CD73 en los diferentes grupos de estudio y a lo largo del tiempo95 |
| -Gráfico 6. Evolución de la expresión del marcador CD90 en los diferentes grupos de estudio y a lo largo del tiempo95 |
| -Gráfico 7. Valores obtenidos en el test de Wilcoxon en la prueba de la producción de fosfatasa alcalina |
| -Gráfico 8. Expresión del gen del colágeno tipo I según el tratamiento y a lo largo del tiempo105 |
| -Gráfico 9. Expresión del gen de la osteocalcina según el tratamiento y a lo largo del tiempo106 |
| |

-Gráfico 10. Expresión del gen del OCT4 según el tratamiento y a lo largo del tiempo......107

1. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

1. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

Actualmente, los implantes dentales son elementos indispensables a la hora de rehabilitar a un paciente que ha perdido uno o varios dientes. Además, con el aumento de la esperanza de vida, ha aumentado, a su vez, el número de adultos con ausencia de piezas dentales.

En muchos casos, y especialmente entre la población anciana, el hueso del que disponemos para colocar los implantes no es suficiente, teniendo que recurrir a injertos óseos (autoinjerto o xenoinjerto).

El futuro de la implantología pasa por acelerar los procesos de osteointegración con elementos que actúen sobre el metabolismo óseo de forma directa, como ocurre con la melatonina. Esta molécula aporta a la implantología un avance importante en la consecución de esta meta.

La acción de la melatonina en la regeneración ósea ha sido estudiada en varias ocasiones. Uno de los primeros estudios realizados en este campo fue el de **Roth y cols.**¹ en 1999. Éstos estudiaron el efecto de la melatonina sobre la modulación de la expresión de la sialoproteina ósea (BSP) en la línea celular de preosteoblastos procedentes de ratas, demostrando que incrementaba la expresión génica de la BSP y otras proteínas marcadoras óseas, incluyendo la fosfatasa alcalina (ALP), la osteopontina y la osteocalcina, en una concentración dependiente molar, reduciendo su periodo de diferenciación a osteoblastos de 21 días a 12 días. En este mismo año, **Nakade y cols.**² demostraron que la melatonina a concentraciones micromolares estimulaba la proliferación y síntesis de colágeno tipo I en los cultivos de osteoblastos

¹ Roth JA, Kim BG, Lin WL, Cho MI. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. J Biol Chem 1999;274:22041-22047.

² Nakade O, Koyama H, Ariji H, Yajimi A, Kaku T. Melation stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells *in vitro*. J Pineal Res 1999;27:106-110.

humanos in vitro. Posteriormente, en 2002, Koyama y cols.³ evaluaron los efectos de la melatonina sobre la masa ósea en un estudio en ratones. Observaron que la melatonina a dosis farmacológicas de 5 a 500 µM aumentaba de manera dosis mensajero dependiente la expresión de ácido ribonucleico (ARNm) de osteoprotegerina en líneas celulares preosteoblásticas MC3T3-E₁, inhibiendo la reabsorción ósea e incrementando la masa ósea a través de la regulación de la osteoclastogénesis. También en el año 2002, Ostrowska y cols.⁴ demostraron como la oscilación a lo largo del día de ciertas hormonas como la parathormona (PTH), la hormona del crecimiento, el factor de crecimiento semejante a insulina 1 (IGF-1), la melatonina y las hormonas tiroideas jugaban un papel muy importante en la expresión de los marcadores bioquímicos del metabolismo óseo. Un año más tarde, de nuevo **Ostrowska y cols.**⁵ manifestaron que la pinealectomía y la administración de melatonina durante largos periodos de tiempo podrían influir en el metabolismo óseo además de producir cambios secundarios en las concentraciones de hormonas calciotropas (IGF-I y corticosterona).

Ladizesky y cols.⁶ en 2006, demostraron que la melatonina a concentraciones micromolares (25 microg/mL) en ratas tratadas con metilprednisolona disminuía la reabsorción ósea, teniendo un efecto protector óseo.

En 2008, el grupo de investigación de **Cutando y cols.⁷ realizó un estudio en perros** donde se evaluó el efecto de la aplicación tópica de melatonina sobre la

³ Koyama H, Nakade O, Takada Y, et al. Melatonin at pharmacologic doses increases bone mass by suppressing resorption through down-regulation of the RANKL-mediated osteoclast formation and activation. J Bone Miner Res 2002;17:1219-1229.

⁴ Ostrowska Z, Kos-Kudla B, Marek B, Kajdaniuk D, Ciesielska-Kopacz N. The relationship between the daily profile of chosen biochemical markers of bone metabolism and melatonin and other hormone secretion in rats under physiological conditions. Neuro Endocrinol Lett 2002;23:417-425.

⁵ Ostrowoska Z, Kos-Kudla B, Nowak M, Swietochowka E, Marek B, Gorski D, Kajdaniuk K. The relationship between bone metabolism, melatonin and other hormones in sham- operarated and pinealectomized rats. Endocr Regul 2003;37:211-224.

⁶ Ladizesky MG, Boggio V, Cutrera RA, Mondelo N, Mastaglia S, Somoza J, Cardinali DP. Melatonin effects on bone metabolism in rats treated with methylprednisolone. J Pineal Res 2006;40:297-304.

osteointegración de implantes dentales. Después de dos semanas se incrementó el perímetro de hueso en contacto con el implante, la densidad ósea así como el hueso interrosca en comparación con los implantes controles.

Takechi y cols.⁸ en 2008, realizaron un estudio histomorfométrico de implantes de titanio a nivel tibial en ratas aplicando una inyección intraperitoneal de melatonina junto con una inyección local de factor de crecimiento fibroblástico-2 (FGF-2) alrededor de los implantes, demostrando que la melatonina promovía la formación ósea alrededor de los mismos.

Guardia y cols.⁹ en 2011, realizaron un estudio histomorfométrico para evaluar el efecto de la aplicación tópica de melatonina sobre la osteointegración de implantes dentales en perros Beagle a las 5 y 8 semanas de su inserción, después de este tiempo la melatonina aumentó significativamente el hueso interrosca y el hueso neorformado en comparación con el lado control. No hallándose diferencias significativas en el incremento del BIC.

Recientemente, **Ramírez Fernández y cols.**¹⁰ realizaron un estudio donde aplicaron melatonina tópica en defectos óseos en conejos. Tras cuatro semanas de estudio, las imágenes radiológicas mostraron una reparación ósea completa de las perforaciones rellenadas con melatonina. Además, encontraron que la hormona aceleró el proceso

⁷ Cutando A, Gomez G, Arana C, Muñoz F, López-Peña M, Stephenson J, Reiter RJ. Melatonin stimulates osteointegration of dental implants. J Pineal Res 2008;45:174-179.

⁸ Takechi M, Tatehara S, Satomura K, Fujisawa K, Nagayama M. Effect of FGF-2 and melatonin on implant bone healing: a histomorphometric study. J Mater Sci Mater Med 2008;19:2949-2952.

⁹ Guardia J, Gómez-Moreno G, Ferrera MJ, Cutando A. Evaluation of Effects of Topic Melatonin on Implant Surface at 5 and 8 Weeks in Beagle Dogs. Clin Implant Dent Relat Res 2011;13:262-268

¹⁰ Ramírez-Fernández MP, Calvo-Guirado JL, de Val JE, Delgado-Ruiz RA, Negri B, Pardo-Zamora G, Peñarrocha D, Barona C, Granero JM, Alcaraz-Baños M. Melatonin promotes angiogenesis during repair of bone defects: a radiological and histomorphometric study in rabbit tibiae. Clin Oral Investig 2012 Feb 11. Doi: 10.1007/s00784-012-0684-6.

de cicatrización, remarcando su gran potencial angiogénico.

Todas estas investigaciones confirman el efecto osteogénico de la melatonina y su papel dentro del metabolismo óseo, lo que puede ser relevante en la clínica odontológica, ya que podría ser usada como un posible agente promotor terapéutico en aquellas situaciones que se desee un aumento de la formación ósea.

2. INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2. 1. Fisiología ósea

El tejido óseo es una variedad de tejido conectivo compuesto por una matriz extracelular mineralizada y células especializadas: osteoblastos, osteocitos y osteoclastos.

La sustancia osteoide o componente orgánico de la matriz, producida por los osteoblastos, está constituida en un 90% por fibras de colágeno tipo I, que representa la proteína estructural fundamental de la matriz ósea. El 10% restante lo componen una serie de proteínas no colágenas de menor tamaño que modulan la mineralización y la unión de las células a la matriz¹¹, y entre las que destacan (Tabla 1):

| Proteínas de la matriz osteoide |
|---|
| 1. Colágeno tipo I (90%) |
| |
| 2. Proteinas no colagenas (10%): |
| a. Glucoproteínas: |
| ✓ Fosfatasa alcalina |
| Glucoproteínas con secuencia RGD (osteopontina, osteonectina, fibronectina, trombospondina, sialoproteínas óseas) |
| b. Proteoglucanos |
| Proteínas con ácido γ-carboxiglutámico (osteocalcina, proteína del osteoide con ácido γ-carboxiglutámico) |
| d. Proteínas séricas retenidas en el hueso |

d. Trotemas serieds retemadas en el naeso

Tabla 1. Principales proteínas constituyentes de la matriz ósea. Tomada de (Guardia Muñoz 2008)¹².

¹¹ Prieto S. Fisiología del hueso. En: Tresguerres JAF, editor. Fisiología Humana. 3º edición. Madrid: Mc-Graw-Hill; 2005. p.981-994.

¹² Guardia Muñoz J. Estudio histomorfométrico sobre el comportamiento de la melatonina en los procesos de osteointegración implantológica (Tesis Doctoral), Universidad de Granada, 2008.

-Fosfatasa alcalina: producida por los osteoblastos, es una enzima que libera fosfato inorgánico a partir de ésteres fosfóricos con un pH óptimo de 8,6. Merced a ello, por un lado incrementa la concentración de iones fosfato necesarios para la mineralización de la matriz orgánica; por otro, bloquea la acción inhibidora que los ésteres fosfóricos poseen sobre la mineralización.

-Glucoproteínas con secuencia RGD (Arg-Gly-Asp): osteopontina, osteonectina, fibronectina, trombospondina y las sialoproteínas óseas contienen repetida la secuencia RGD, que es reconocida específicamente por las integrinas de osteoblastos y osteoclastos. Constituye un sistema de reconocimiento que permite el anclaje de las células óseas a la matriz y su migración sobre ella, base de los procesos de mineralización, remodelado y reparación del hueso.

-Proteoglucanos: constituidos por un núcleo proteico en el que se engarzan glucosaminoglucanos, son macromoléculas sintetizadas por los osteoblastos. En la matriz osteoide existen al menos cuatro tipos de estas moléculas: *condroitín sulfato, hialuronano, decorina y biglucano.*

-Proteínas con ácido γ-carboxiglutámico (osteocalcina y proteína del osteoide con ácido γ-carboxiglutámico): este aminoácido modificado se combina con dos iones Ca⁺² entre sus dos grupos carbonilo. Los osteoblastos sintetizan *osteocalcina* (una proteína cuyas concentraciones en plasma guardan cierta correlación con la mineralización) y la *proteína del osteoide con ácido γ-carboxiglutámico*, que inhibe la mineralización del colágeno en tejidos no óseos.

-Proteínas séricas retenidas en el mineral óseo: en el tejido óseo se hallan cantidades significativas de albúmina, inmunoglobulinas, hemoglobina, α_1 -antitripsina, β_2 -microglobulina, α_2 -SH-glucoproteína y lipoproteína Apo A-1.

La *fase inorgánica* está compuesta por pequeños cristales de un mineral de carácter alcalino, la hidroxiapatita [Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂]. Estos cristales se incrustan entre las fibras

8

de colágeno para formar un tejido que reúne las características adecuadas de rigidez, flexibilidad y resistencia^{13,14}.

2. 1. 1. Osteoblastos y osteocitos

Al microscopio óptico, los osteoblastos maduros son células grandes de forma cuboidea, de 20-30 μm de diámetro mayor, con un núcleo ovalado y citoplasma basófilo azulado por su abundante ARN (Figura 1).



Figura 1. Tejido óseo en el que se observan numerosos osteoblastos.

¹³ Arnett, TR. Estructura y remodelado del hueso. En: J. A. Riancho Moral and J. Gonzales Macías, editors. Manual Práctico de Osteoporosis y Enfermedades del Metabolismo Mineral. Madrid: Jarpyo Editores; 2004. p. 1-6.

¹⁴ Gehron Robey P.Bone matrix proteoglycans and glucoproteins. In: Bilezikian JP, Raisz LG, and Rodan GA, editors. Principles of bone biology. 2º edition. Volume 1. San Diego, California: Academic Press; 2002. p. 225-238.

Embriológicamente los osteoblastos derivan de células progenitoras multipotenciales del estroma medular. Estas células originan osteoblastos, además de fibroblastos, condrocitos, adipocitos y células musculares, algunas de cuyas características fenotípicas son semejantes a las del osteoblasto.

Los osteoblastos son células secretoras metabólicamente activas que expresan proteínas como la osteocalcina y osteopontina, la osteonectina y otros proteoglicanos y factores señalizadores solubles (BMPs, TGF-β, IGF I y II, IL-1 y PDGF). La expresión de estos productos por parte de los osteoblastos ocurre durante la embriogénesis ósea y durante su mantenimiento (remodelación) y reparación.

Aunque los osteoblastos están polarizados hacia el hueso, la liberación de las proteínas de la matriz osteoide no se limita a su polo basal, sino que muchos de ellos van quedando envueltos en tal matriz, convirtiéndose en osteocitos incluidos en las lagunas que se forman en ella. Junto con ese destino, los osteoblastos pueden derivar a osteocitos de superficie, también conocidos como células limitantes o de revestimiento. Ambos tipos de osteocitos poseen receptores para PTH y expresan in vivo ARNm de: actina-β, factores de transcripción c-fos y c-jun, colágeno y proteínas no colágenas, así como el ARNm del factor de crecimiento semejante a insulina I (IGF-I)¹⁵.

En el hueso ya formado, los osteocitos incluidos en las lagunas u osteoplasmas en la matriz mineralizada, poseen forma estrellada, con numerosas y finas prolongaciones, y están comunicados entre sí por una red de canales, o conductos calcóforos, bañada por el denominado fluido óseo. Con microscopía electrónica se ha observado que en el interior de esos canales los osteocitos contactan mediante sus prolongaciones, lo que permite su comunicación con la superficie del hueso. Precisamente, un papel fisiológico primordial de los osteocitos es la detección de estímulos mecánicos y

¹⁵ Lean JM, Mackay AG, Chow JW, Chambers TJ. Osteocytic expression of mRNA for c-fos and IGF-I: an immediate early gene response to an osteogenic stimulus. Am J Physiol 1996;270:937-945.

variaciones de tensión y morfología del hueso producidos por las cargas que soportan en su superficie, así como su traducción en el remodelado óseo.

Cuando se produce la reabsorción del hueso por los osteoclastos, los osteocitos quedan fuera de las lagunas como células de revestimiento en reposo¹¹.

2.1.2. Osteoclastos

Los osteoclastos derivan embriológicamente de células progenitoras hematopoyéticas denominadas "unidades formadoras de colonias de granulocitos-macrófagos" (conocidas habitualmente por su acrónimo inglés, *GM-CFU: granulocyte-macrophage colony-forming units*), que son, además, y como su nombre indica, precursoras de granulocitos, monocitos y macrófagos. Estas células progenitoras alcanzan el hueso bien directamente, desde la médula incluida en su seno, bien desde la sangre circulante.

Las células precursoras de osteoclastos y éstos mismos expresan en su superficie el receptor de L-RANK producido por los osteoblastos, vía por la que, junto con citoquinas como las interleuquinas 1, 6 y 11, el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), el interferón y y el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), se diferencian y se activan¹⁶. Morfológicamente, los osteoclastos son células gigantes (20-100 µm de diámetro), multinucleadas, ricas en vacuolas y mitocondrias y, como los osteoblastos, polarizadas (sus acciones se localizan en regiones determinadas de su superficie) (Figura 2). Así, se caracterizan por poseer en una de sus caras una serie de finísimos entrantes y salientes, el denominado borde plegado (o en cepillo), a través del que se desarrollará la reabsorción ósea. En el citoplasma próximo a dicho borde se encuentra

¹⁶ Takahashi N, Udagawa N, Takami M, Suda T. Cells of bone: osteoclast generation. In: Bilezikian JP, Raisz LG, and Rodan GA, editors. Principles of bone biology. 2º edition. Volume 1. San Diego, California: Academic Press; 2002. p. 109-126.

la conocida como *área clara*, rica en proteínas y filamentos del citoesqueleto, y desde la que se proyectan integrinas que alcanzan el espacio extracelular¹¹.



Figura 2. Osteoclasto.

2. 1. 2. 1. Mecanismos de reabsorción ósea

La reabsorción ósea es un proceso complejo que incluye la disolución de la fase mineral o inorgánica y la posterior degradación de las proteínas de la matriz ósea. Los mecanismos señalizadores responsables de la formación y activación de los osteoclastos no son del todo conocidos. Sí sabemos que estas células sintetizan enzimas necesarias para la reabsorción ósea y expresan una ATPasa bombeadora de protones, un intercambiador de bicarbonato/cloro, una fosfatasa ácida resistente a tartrato, catepsina K y la anhidrasa carbónica tipo II.

Los osteoclastos se adhieren a la superficie ósea mediante integrinas que reconocen específicamente a proteínas de la matriz osteoide. El área de sellado delimita un microespacio entre los osteoclastos y la superficie ósea. La desmineralización se produce mediante la acidificación de ese microespacio gracias a la acción de una ATPasa de H⁺ localizada en la membrana del borde en cepillo. Para mantener el pH fisiológico en su seno, el osteoclasto dispone de un intercambiador Cl⁻/HCO3⁻ en la cara opuesta al borde en cepillo y, en este borde, un canal de Cl- acoplado a la ATPasa de H⁺. Como consecuencia de todo lo anterior, el osteoclasto secreta HCl en el microespacio subosteoclástico, con el consiguiente descenso del pH hasta 4.4 y la disolución del mineral (Figura 3). Esta disolución precede a la degradación de la matriz orgánica, llevada a cabo, a su vez, por proteasas como la catepsina K, secretada por los osteoclastos, y colagenasa por los osteoblastos^{17,18}.



Figura 3. Esquema del mecanismo de reabsorción ósea. Tomada de (Guardia Muñoz 2008)¹².

¹⁷ Väänänen K, Zhao H. In: Bilezikian JP, Raisz LG, and Rodan GA, editors. Principles of bone biology. 2º edition. Volume 1. San Diego, California: Academic Press; 2002. p. 127-140.

¹⁸ Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. Science 2000;289:1504-1508.

2. 1. 2. 2. Radicales libres y reabsorción ósea

Según diversos estudios los radicales libres actúan como intermediarios importantes en la formación y activación de nuevos osteoclastos e intervienen en el proceso de reabsorción ósea¹⁹.

En un estudio realizado por **Fallon y cols.**²⁰ se observó que los osteoclastos poseen superóxido dismutasa y son los responsables de la producción de *Reactive Oxygen Species* (ROS) en el microambiente óseo, lo que contribuiría a la degradación de componentes de la matriz ósea bajo el borde en cepillo, ya que moléculas estructurales de la matriz como el colágeno o el ácido hialurónico son susceptibles al daño oxidativo por radicales libres.

Se sabe además que los osteoclastos expresan otra enzima, la fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP), que se localiza en el interior de vesículas endocíticas que contienen productos de degradación orgánicos liberados de la matriz ósea durante la reabsorción. Esta enzima posee un centro binucleado con un hierro activo que es capaz de reaccionar con el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) mediante la reacción de Fenton para producir radical hidroxilo:

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + HO_{\bullet}$$

El ión férrico formado en la reacción es capaz de reaccionar también con H₂O₂ para formar anión superóxido e ión ferroso:

$$Fe^{3+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{2+} + 2H^+ + O_2^- \bullet$$

Por tanto, se establece a nivel osteoclástico una secuencia de reacciones que originan $HO \cdot y O_2^{-} \cdot$ mediante la continua oxidación y reducción del hierro activo de la TRAP,

¹⁹ Garret IR, Boyce BF, Oreffo RO, Bonewald L, Poser J, Mundy GR. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone *in vitro* and *in vivo*. J Clin Invest 1990;85:632-639.

²⁰ Fallon M, Silverton S, Smith P, Moskal T, Constantinescu C, Feldman R, Golub E, Shapiro I. The oxidative metabolism of isolated osteoclasts is regulated by calcitropic agents. J Bone Miner Res 1986;Abstr.1.

haciendo posible la síntesis de elevadas cantidades de ROS en la medida en que se encuentre disponible el H_2O_2 en el medio.

El papel fisiológico de estas ROS en el proceso de reabsorción ósea no es del todo conocido, pero sí sabemos que atacan directamente al colágeno tipo I y otras proteínas estructurales de la matriz extracelular, contribuyendo a su fragmentación. Los productos resultantes penetran mediante endocitosis en vesículas intracelulares que contienen TRAP, enzima encargada de la degradación última de los componentes de la matriz. Finalmente, estos productos de degradación son secretados al espacio extracelular a nivel de la membrana basolateral de la célula²¹.

2. 2. Células madre procedentes de médula ósea

2. 2. 1. Concepto, antecedentes y tipos principales

Una célula madre (también denominada célula *stem*) se define como aquella que tiene las siguientes tres características²²:

- Capacidad de autorrenovación o de formar durante su división al menos una copia idéntica de la célula inicial, con las mismas características y propiedades biológicas.
- b. Capacidad de diferenciación hacia una (o varias) células maduras con función especializada.
- c. Capacidad de proliferación a largo plazo.

²¹ Hallen JM, Raisanen S, Salo JJ, Reddy SV, Roodman GD, Hentunen TA, Lehenkari PP, Kaija H, Vihko P, Väänänen HK. Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. J Biol Chem 1999;274:22907-22910.

²² Verfaillie CM. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. Trends Cell Biol 2002;12:502-508.

En los años 60, los experimentos de **Till y Mc Culloch** basados en el trasplante de células mononucleadas de la médula ósea en ratones letalmente irradiados, demostraron por primera vez la existencia de células con estas propiedades en la médula ósea, las células madre hematopoyéticas²³.

Se sabe que en la médula ósea existen diversos tipos celulares, algunos de ellos con características de célula stem. Entre ellos se pueden distinguir los siguientes:

- Multipotent Adult Progenitor Cells.
- Hemangioblasto.
- Célula madre hematopoyética.
- Célula madre mesenquimal (CMM).

2. 2. 2. Célula madre mesenquimal

2. 2. 2. 1. Definición y morfología

Las CMM son células que residen en el interior de la médula ósea, que no son células hematopoyéticas, con aspecto fibroblástico y características de célula stem: capacidad de autorrenovación, proliferación y con capacidad de diferenciarse a varias líneas de tejido mesodérmico^{24,25}.

Se caracterizan morfológicamente por ser células pequeñas, largas y estrechas con pocos procesos celulares. En el interior se encuentra un núcleo grande y redondo con un nucleolo prominente. El cuerpo celular contiene además aparato de Golgi, retículo endoplasmático rugoso, mitocondrias y polirribosomas (Figura 4).

²³ Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. Radiat Res 1961;14:213-222.

²⁴ Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. J Embryol Exp Morphol 1966;16:381-390.

²⁵ Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968;6:230-247.



Figura 4. Células madre mesenquimales. (Microscopio óptico, 20X).

Con el fin de consensuar una definición de las células madre mesenquimales la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) *"The Mesenchymal and Tissue Stem Cells Committe of the Internaltional Society for Cellular Therapy"* propuso unos criterios mínimos necesarios para definirlas. Dichos criterios son²⁶:

- Capacidad de adherencia al plástico cuando se mantienen en condiciones de cultivo estándar.
- Más del 95% de la población debe expresar los antígenos específicos de superficie CD90, CD73 y CD105 y ausencia de marcadores hematopoyéticos como CD45, CD34, CD14 ó CD11b, CD79α ó CD19 y HLA clase II.
- Capacidad de diferenciación *in vitro* a osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo condiciones estándar de diferenciación.

²⁶ Dominici M, Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop DJ, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. Cytotherapy 2006;8:315-317.

Estas células tienen capacidad clonogénica de manera que cuando se cultivan a baja densidad tienen la propiedad de formar colonias de aspecto fibroblástico²⁷.

2. 2. 2. 2. Diferenciación a osteoblastos

La diferenciación hacia osteoblastos de las CMM ha sido ampliamente demostrada *in vitro*. Habitualmente se realiza mediante el cultivo de una capa adherente de CMM en medio de inducción osteogénica, el cual suele incluir dexametasona, ácido ascórbico y β -glicerofosfato^{28,29}. Primero, las CMM forman agregados o nódulos y aumenta la expresión de la fosfatasa alcalina. A partir de la primera semana, se puede observar la aparición de depósitos de calcio (Figura 5), pero no es hasta la tercera semana cuando se obtiene una diferenciación completa.



Figura 5. Depósitos de calcio en cultivo en medio osteogénico (microscopio óptico, 10X).

²⁷ Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kapoor N, Meyers P, Chiarieri D, McKenzie S, Broxmeyer HE, Moore MA. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. Blood 1980;56:289-301.

²⁸ Coelho MJ, Fernandes MH. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, betaglycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. Biomaterials 2000;21:1095–1102.

²⁹ Sugiura F, Kitoh H, Ishiguro N. Osteogenic potential of rat mesenchymal stem cells after several passages. Biochem Biophys Res Commun 2004;316:233–239.

Tanto la aparición de depósitos de calcio como el aumento de la actividad de la fosfatasa alcalina pueden valorarse por métodos histoquímicos o por técnicas de genética molecular.

2. 2. 2. 3. Diferenciación a adipocito

La diferenciación hacia adipocito se consigue in vitro al incubar las CMM en presencia de un medio de diferenciación que suele incluir dexametasona, insulina, isobutilmetilxantina e indometacina³⁰.

2. 2. 2. 4. Diferenciación a condrocito

Para la diferenciación condrogénica de las CMM se utiliza un medio que contiene dexametasona, ácido linoleico, insulina bovina, transferrina o factores de crecimiento más específicos como los de la familia del TGF- β^{31} .

2. 2. 2. 5. Potencial terapéutico de las CMM

Aunque la investigación con CMM está todavía en sus comienzos, gracias a su fácil adquisición y a su rápida expansión *ex vivo* junto con los avances actuales y los innovadores métodos biológicos en el campo de la ingeniería de tejidos y de la medicina regenerativa, la terapia con células madre podría traducirse en exitosas aplicaciones clínicas en poco tiempo.

³⁰ Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999;284:143-147.

³¹ Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. Tissue Eng 1998;4:415-428.

Las células madre son una herramienta muy potente parar tratar problemas médicos de cualquier índole y obtener resultados muy efectivos. Esto se debe a su capacidad de diferenciación y, por lo tanto, a su capacidad de reemplazar, reparar o mejorar las funciones biológicas de los tejidos específicos u órganos dañados.

2. 3. Melatonina

2. 3. 1. Definición, historia y biosíntesis

La melatonina es la N-acetil-5-metoxitriptamina, una hormona sintetizada y secretada por la glándula pineal, descrita inicialmente por **McCord y Allen**³² (1917) y aislada por primera vez por **Lerner y cols.**³³ (1958).

Es una molécula que tiene su origen en la glándula pineal; se trata de un órgano impar de un peso aproximado de 120 mg con forma de cono aplanado, es una prominencia dorsal de la pared posterior del tercer ventrículo y por ello se sitúa entre los tubérculos superiores del mesencéfalo, en la fosa pineal (Figura 6).

La primera descripción de la glándula pineal se atribuye a Herófilo de Alejandría, en el siglo III a.C, quien la vinculó a funciones valvulares reguladoras del "flujo del pensamiento" en el sistema ventricular.

Galeno (siglo II a.C) describió su anatomía y la llamó *konarium* (cono de piña), denominación que ha perdurado hasta nuestros días junto con la de pineal (del latín *pinea*, piña). En el Renacimiento, Andrés Vesalio, aportó una descripción anatómica precisa en su obra *De Humani Corporis Fabrica* (1543). René Descartes la calificó en su póstumo *De Homine* (1633) de tercer ojo, no por su papel en el control del

³² Mc Cord CP, Allen FB. Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation. J Exp Zool 1917;23:207-224.

³³ Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. J Am Chem Soc 1958;80:2587.

fotoperiodo, aún desconocido, sino, porque, según su concepción dualista, constituía la sede del alma.



Figura 6. Corte sagital del cerebro. Tomada de (Guardia Muñoz 2008)¹⁸

Es en el siglo XIX cuando se aborda la glándula pineal desde diferentes frentes: anatómico, histológico y embriológico, y se mostró su semejanza con la epífisis de vertebrados inferiores. En el siglo XX, Heubner relacionó la glándula pineal con la reproducción, pero es en 1943, cuando Bargman sugirió que la función endocrina de la glándula pineal estaba regulada por la luz a través del sistema nervioso central.

La era actual del conocimiento pineal se inicia en 1954, Julian Kitay y Mark Altschule atribuían a la glándula tres propiedades: su intervención en el control de la función gonadal, su participación en la respuesta cromática dérmica a los cambios de luz ambiental en vertebrados inferiores y alguna vinculación con la conducta. Por último, en 1965, dos hechos contribuyeron a consolidar el concepto de la glándula pineal como órgano neuroendocrino activo en mamíferos. Hoffman y Reiter demostraron que la oscuridad, o fotoperiodos cortos, inducían cambios gonadales en el hámster, que podían ser suprimidos por la pinealectomía. Axelrod y Wurtman acuñaron la expresión "transductor neuroendocrino" para describir la glándula como un órgano que convierte un estímulo neural proveniente de la retina y originado por la luz ambiental en una respuesta endocrina, la producción de melatonina³⁴. Las células encargadas de sintetizar la melatonina son los pinealocitos, siendo éstas las células parenquimales de la glándula pineal. Son células que responden a los cambios en la luminosidad durante el ciclo luz/oscuridad, lo que hace que su actividad metabólica se sincronice a un periodo de 24 horas denominado ritmo circadiano. En sujetos normales la mayor secreción de melatonina se produce entre las doce de la noche y las dos de la madrugada, y la mínima entre el medio día y las dos de la tarde³⁵.

La biosíntesis pineal comienza con la captación del triptófano, aminoácido aromático esencial, a través de un mecanismo de transporte activo que está bajo control adrenérgico. Dentro de la célula el triptófano se convierte en 5-hidroxitriptófano por la enzima triptófano 5-hidrolasa que a su vez es convertido a 5-hidroxitriptamina (serotonina) por la enzima L-triptófano descarboxilasa. La enzima que limita la cantidad, serotonina N-acetiltransferasa, convierte la serotonina en N-acetilserotonina, que es convertido a melatonina por medio de la enzima 5-hidroxiindol-O-metiltransferasa, que utiliza como donante del grupo metil a la S-adenosil metionina³⁶. (Figura 7).

³⁴ Guerrero J, Carrillo-Vico A, Lardone P. La melatonina. Investigación y Ciencia 2007;373:30-38.

³⁵ Simonneaux V, Ribelayga C. Generation of the Melatonin Endocrine Message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. Pharmacol Rev 2003;55:325-395.

³⁶ Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowski T, Bubenik GA. Role of melatonin in upper gastrointestinal tract. J Physiol Pharmacol 2007;58:23-52.



Figura 7. Biosíntesis de la melatonina a partir del triptófano. Modificada de (Pandi-Perumal 2006)³⁷.

Inicialmente la melatonina se definió como la hormona que mediaba las variaciones anuales en la capacidad reproductora de animales con ciclos de reproducción estacionales. Actualmente se sabe que influye en numerosos aspectos de la biología circadiana, acciones mediadas por la unión de la hormona a receptores de membrana^{38,39}. Estudios posteriores han permitido relacionar a la melatonina con aspectos de la fisiología intracelular a través de mecanismos que son independientes de la acción de la hormona sobre receptores de membrana. En este sentido, se han

³⁷ Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJM, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R. Melatonin. Nature's most versatile biological signal? FEBS Journal 2006;273:2813-2838.

³⁸ Vanecek J. Melatonin binding sites. J Neurochem 1988;51:1436-1440.

³⁹ Cajochen C, Kräuchik, Wirz-Justice A. Role of Melatonin in the regulation of Human Circadian Rhytms and Sleep. J Neuroendocrinol 2003;15:432-437.
identificado y caracterizado receptores nucleares para la melatonina en órganos periféricos^{40,41} y células del sistema nervioso central⁴². (Figura 8).



Figura 8. Principales mecanismos de acción de la melatonina. Tomada de (Fuentes 2008)⁴³.

⁴⁰ Acuña-Castroviejo D, Pablos MI, Menéndez-Peláez A, Reiter RJ. Melatonin receptors in purified cell nuclei of liver. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 1993;82:253-256.

⁴¹ Hirose T, Smith RJ, Jetten AM. The third member of RZR/ROR orphan receptor subfamily that is highly expressed in skeletal muscle. Biochem Biophys Res Commun 1994;205:1976-1983.

⁴² Carlberg C, Hooft van Huijsduijnen R, Staple J, DeLamater JF, Becker-André M. RZRs, a novel class of retinoid related orphan receptor that function as both monomers and homodimers. Mol Endocrinol 1994;8:757-770.

Los efectos de la melatonina están mediados por receptores de alta afinidad. Podemos distinguir dos receptores: de alta afinidad MT₁ MT₂ y receptores de baja afinidad MT₃. Los receptores MT₁ y MT₂ son receptores de membrana acoplados a proteínas G inhibidoras. Debido a que estos receptores están localizados en la membrana plasmática, la melatonina regula la función celular a través de segundos mensajeros intracelulares, disminuyendo la concentración intracelular de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y también se ha encontrado efectos sobre otros segundos mensajeros como el Ca²⁺, guanosín monofosfato cíclico (GMPc), proteina Kinasa. El receptor MT₃ no acoplado a proteína G, cuando es activado estimula la hidrólisis de fosfoinositol⁴⁴.

Por otro lado, la melatonina, por ser una molécula pequeña y de naturaleza lipofílica, también es capaz de atravesar la membrana celular y de unirse a nivel intracelular, citosólico y nuclear. Los receptores nucleares son proteínas localizadas en el interior del núcleo, capaces de unirse a la región reguladora de algunos genes. Estas proteínas regularían la actividad de la ARNpolimerasa II. Se ha demostrado también la capacidad de la melatonina para unirse a proteínas citosólicas como la proteína kinasa C⁴⁵, la calmodulina⁴⁶ y calreticulina⁴⁷, probablemente, también a la quinona-reductasa-2⁴⁸. La calmodulina es una proteína cuya función principal es quelar el calcio, lo que permite modular la actividad de muchas enzimas. Entre las enzimas que regula se encuentra la

⁴³ Fuentes Broto L. Melatonina como protector frente a los radicales libres en la hepatotoxicidad por ácidos biliares (Tesis Doctoral), Universidad de Zaragoza, 2008.

⁴⁴ Dubocovich ML, Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonina receptors in mammals. Endocrine 2005;27:101-110.

⁴⁵ Anton-Tay F, Ramirez G, Martínez I, Benitez-King G. In vitro stimulation of protein Kinase C by melatonin. Neurochem Res 1998;23:601-606.

⁴⁶ Huerto-Delgadillo L, Antón-Tay F, Benitez-King G. Effects of melatonin on microtube assembly depend on hormone concentration: Role of melatonin as a calmodulin antagonist. J Pineal Res 1994;17:55-62.

⁴⁷ Macias M, Escames G, León J, Coto A, Sbihi Y, Osuna A, Acuña-Catroviejo D. Calreticulin-melatonin. An unexpected relationship. Eur J Biochem 2003;270:832-840.

⁴⁸ Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Tamura H, Reiter RJ. Melatonin as a naturally occurring co-substrate of quinone reductase-2, the putative MT3 melatonin membrane receptor: hypothesis and significance. J Pineal Res 2007;43:317-320.

fosfodiesterasa de los nucleótidos cíclicos y adenilatociclasa necesaria para la formación de AMPc intracelular. Cuando la melatonina interactúa con la calmodulina, inhibe la actividad fosfodiesterasa de forma concentración dependiente, lo cual permite modular directamente las señales intracelulares del calcio. La calreticulina es una proteína del retículo endoplasmático que también se une al calcio. Se trata de una proteína que regula la homeostasis intracelular del Ca²⁺. La unión de la melatonina a la calreticulina es altamente específica y se produce con una afinidad en rango molar⁴⁷. La proteína kinasa C es una quinasa de serina y treonina activada por Ca²⁺. Esta enzima fosforila diversos sustratos y modifica la estructura del citoesqueleto. La melatonina activa la proteína kinasa C⁴⁹. Los resultados obtenidos de la interacción de la melatonina puede contribuir a modular el citoesqueleto.

Otro lugar de unión de la melatonina parece encontrarse en la mitocondria⁵⁰. La proteína de unión se localiza en la rampa anfipática del complejo I de la cadena de transporte electrónico mitocondrial⁵¹.

Según todos estos datos, hoy día se empieza a considerar a la melatonina no como una hormona en el sentido clásico, sino como un *protector celular* conservado evolutivamente. Esta afirmación se basa en dos hechos:

 No se sintetiza en un órgano específico. Se sabe que las enzimas requeridas para la biosíntesis de la melatonina se encuentran en otros tejidos además de la pineal, y se sabe que diversos de estos tejidos, entre los cuales están la retina, el bazo, el timo, los linfocitos B, el ovario, el testículo y el intestino, producen

⁴⁹ Benitez-King G, Rios A, Martinez A, Antón-Tay F. In vitro inhibition of CA2+/calmodulin- dependent Kinasa II activity by melatonin. Biochim Biophys Acta 1996;1290:191-196.

⁵⁰ Hardeland R, Poeggeler B. Actions of melatonin, it's structural and functional analogs in the Central Nervous System and the significance of metabolism. Cent Nerv Syst Agents Med Chem 2007;7:289-303.

⁵¹ Hardeland R. Melatonin, hormone of darkness and more: occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. Cell Mol Life Sci 2008;65:2001-2018.

melatonina. De todas formas, la melatonina circulante deriva esencialmente de la producida por la pineal, que pasa tanto a la circulación cerebral y sistémica, como al líquido cefalorraquídeo. La melatonina extrapineal es producida por órganos específicos para su uso y no sale a la circulación⁵².

 No actúa en un órgano diana específico. La melatonina alcanza todos los tejidos de la economía⁵³ y, al ser altamente lipofílica, puede actuar a todos los niveles de la célula. Además, diversas organelas acumulan melatonina, como el núcleo y la mitocondria^{38,54}.

2. 3. 2. Ritmos circadianos

La melatonina es un mensajero hormonal del núcleo supraquiasmático y regulador de la actividad de este núcleo. Una vez sintetizada, se secreta a la sangre y pasa a diversos fluidos corporales como el líquido cefalorraquídeo, ya que al ser una molécula lipofílica atraviesa la barrera hematoencefálica.

La síntesis de la melatonina en la glándula pineal se produce de manera circadiana y no se almacena, sino que se libera en cuanto se sintetiza⁵⁵, lo que hace que los niveles de melatonina circulantes varíen con un periodo circadiano y sean más altos durante el periodo de oscuridad. La magnitud y duración en el incremento nocturno es dependiente de la longitud de la fase de oscuridad del ciclo fotoperiodo y actúa como un reloj para la regulación de las actividades biológicas. Siendo este un mensaje de

⁵² Reiter RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. Endocrine Rev 1991;12:151-180.

⁵³ Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Zhang M, Weintraub ST, Cabrera J, Sainz RM, Mayo JC. Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: Its origin and significance. Biochim Biophys Acta 1999;1472:206-214.

⁵⁴ Acuña-Catroviejo D, Escames G, Carazo A, Leon J, Khaldy H, Reiter RJ. Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitocondrialrelated diseases. Curr Topics Med Chem 2002;2:133-151.

⁵⁵ Reiter RJ. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. Experentia 1993;49:654-664.

oscuridad y no de periodo de sueño. Esta producción circadiana de melatonina es el resultado de la llegada de información nerviosa a la glándula pineal desde el núcleo supraquiasmático. Este último núcleo proyecta al núcleo paraventricular, que a su vez proyecta directamente a las neuronas de la columna intermedia de la médula espinal. Estas neuronas preganglionares inervan al ganglio cervical superior, que inerva a la glándula pineal⁵⁶ (Figura 9).

Por la noche, las neuronas postganglionares del ganglio cervical superior estimulan la síntesis de melatonina en la glándula pineal. La melatonina se libera durante la noche a través de la activación postsináptica de receptores β -adrenérgicos. Esto es así, ya que la luz evita la activación adrenérgica de la glándula pineal, produciéndose una inhibición en la síntesis de melatonina.



Figura 9. Vía nerviosa de la regulación de la síntesis de melatonina. Tomada de (Fuentes 2008)⁴⁴.

⁵⁶ Moore RY. Suprachiasmatic nucleus in sleep-wake regulation. Sleep Med 2007;8:27-33.

2. 3. 3. Propiedades

2. 3. 3. 1. Antioxidante y depurador de radicales libres

Se ha demostrado que la melatonina tiene propiedades antioxidantes. Esta característica, descrita inicialmente por **lanas y cols.**⁵⁷, ha sido posteriormente confirmada por numerosos estudios utilizando diferentes modelos experimentales⁵⁸. La melatonina tiene la capacidad de eliminar, depurar o neutralizar radicales libres, principalmente el radical hidroxilo (HO•)⁵⁹, pero también radicales peroxilo (ROO•)⁶⁰, H₂O₂, óxido nítrico (NO•) y peroxinitritos (ONOO⁻)⁶¹.

Una de las características físico-químicas de la melatonina para entender su gran eficacia como antioxidante es su elevada capacidad de difusión. Se trata de una molécula muy lipofílica, capaz de atravesar cualquier membrana celular, o de las diferentes organelas subcelulares⁶². Esta propiedad implica una función de la melatonina en todas las partes del organismo, dado que tiene acceso a todas las células y a todos sus compartimentos. En segundo lugar, tiene un potencial redox muy alto, de alrededor de 0.74 V, lo que le confiere una alta capacidad de ceder un electrón para reducir cualquier molécula que esté a su alcance. El mecanismo por el cual la melatonina puede neutralizar ROS y fundamentalmente el radical HO• consiste en que

⁵⁷ Ianas O, Olnescu R, Badescu I. Melatonin involvement in oxidative stress. Rom J Endocrinol 1991;29:147-153.

⁵⁸ Cuesta S, Kireev R, García C, Forman K, Escames G, Vara E, Tresguerres JA. Beneficial effect of melatonin treatment on inflammation, apoptosis and oxidative stress on pancreas of a senescence accelerated mice model. Mech Ageing Dev 2011;132:573-582.

⁵⁹ Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ. Melatonin; A potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. Endocr J 1993;1:57-60.

⁶⁰ Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchoni R, Marcheselli F. Melatonin: A peroxyl radical scavenger more potent tan vitamin E. Life Sci 1994;55:271-276.

⁶¹ Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, López-BurilloS, Sainz RM, Mayo JC. Melatonin: detoxification of oxygen and nitrogen-based toxic reactants. Adv Exp Med Biol 2003;527:539-548.

⁶² Costa EJX, Lopes RH, Lamy-Freund MT. Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. J Pineal Res 1995;19:123-126.

esta indolamida cede un electrón al radical, eliminando su elevada reactividad y, por tanto, su toxicidad. De esta manera, la propia melatonina se convierte en un radical denominado *radical catión indolilo*⁶³. Éste interacciona entonces con un radical anión superóxido, precursor del HO•, para generar el metabolito no enzimático de la melatonina, la N¹-acetil-N²-formil-5-metoxiquinurenamina (aFMK), que se elimina en la orina (Figura 10).



N1-acetil-N2-formil-5-metoxikinurenamina

Figura 10. Mecanismo de neutralización de un radical hidroxilo y un radical anión superóxido por la melatonina. Tomada de (Guardia Muñoz 2008)¹².

⁶³ Poeggeler B, Saarela S, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, Manchester LC, Barlow-Walden LR. Melatonin a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: New aspects of the oxidation chemistry of this indole assessed *in vitro*. Ann N Y Acad Sci 1994;738:419-420.

En este sistema directo de eliminación de radicales libres, la melatonina y su radical catión indolilo eliminan en realidad dos radicales libres a la vez, uno hidroxilo y otro superóxido. Por tanto, la capacidad de actuar como neutralizador de radicales HO• de la melatonina es altamente específica, y depende, como hemos visto ya, de la estructura química de la molécula.

Esta acción directa como neutralizador de radicales libres se complementa con un efecto estimulante de la actividad y expresión de otros sistemas antioxidantes, estableciendo así una forma de acción indirecta para la reducción del estrés oxidativo⁶⁴. Debido a este efecto y a su elevada lipofilia, que le permite actuar a todos los niveles celulares (membrana, citosol, núcleo, mitocondria), su actividad antioxidante es más eficaz que la de otros antioxidantes ya conocidos⁵⁸.

2. 3. 3. 2. Inmunomodulador

La relación entre melatonina y sistema inmune es cada vez más estrecha. En situaciones en las que se produce una inhibición en la producción de melatonina se observa un estado de inmunodepresión que desaparece cuando se administra la hormona. También ciertos efectos inmunodepresivos producidos por algunos fármacos son contrarrestados por la melatonina⁶⁵.

Aunque está clara la relación entre la melatonina y el sistema inmune, no es así la forma en la cual se realiza esta influencia sobre la denominada cascada natural de las citoquinas en el sistema inmunitario. La relación entre IL-2 y melatonina (función de

⁶⁴ Mayo JC, Sainz RM, Tan DX, Hardeland R, Leon J, Rodriguez C, Reiter RJ. Anti-inflamatory actions of melatonin and its metabolites, N1 acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK), and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK) in macrophages. J Neuroimmunol 2005;165:139-149.

⁶⁵ Guerrero JM, Reiter RJ. Melatonin-Immune System Relationships. Curr Topics Med Chem 2002;2:167-179.

neuroinmunomodulación) se demuestra en diversas investigaciones⁶⁶. García-**Maurino y cols.**⁶⁷ señalan en un estudio realizado in vitro que la melatonina es capaz de activar los linfocitos CD4+ aumentando la producción de IL-2 e IFN- γ , lo que podría sugerir que la melatonina puede estar implicada en la regulación de las funciones inmunes en humanos modulando la actividad de las células CD4 y monocitos.

2. 3. 3. 3. Estimulador de la formación ósea

Numerosos trabajos señalan a la melatonina como un importante mediador en la estimulación y formación de hueso. A concentraciones micromolares la melatonina estimula la proliferación y la síntesis de fibras de colágeno tipo I en osteoblastos humanos in vitro².

Por otra parte, en cultivos de preosteoblastos procedentes de ratas aumenta la expresión génica de la BSP y de otros marcadores proteicos de hueso, incluyendo la ALP, la osteopontina y la osteocalcina, de una manera dosis-dependiente, reduciendo su periodo de diferenciación a osteoblastos de 21 días, que es lo normal, a 12 días. Esta acción parece estar mediada por los receptores de membrana de la hormona¹.

Dentro del metabolismo óseo, otra importante acción biológica directa de la melatonina se centra en el osteoclasto, célula multinucleada encargada de la reabsorción de matriz extracelular mediante diversos mecanismos, dentro de los cuales ya hemos visto que se encuentra la producción de radicales libres. La melatonina, a través de su acción antioxidante y depuradora de radicales libres

⁶⁶ García-Maurino S, González-Haba MG, Calvo JR, Goberna R, Guerrero JM. Involvement of nuclear bindings sites for melatonin in the regulation of IL-2 and IL-6 production by human blood mononuclear cells. J Neuroimmunol 1998;92:76-84.

⁶⁷ García-Maurino S, González-Haba MG, Calvo JR, Rafii El Idrissi M, Sánchez-Margalet V, Goberna R, Guerrero JM. Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. J Immunol 1997;159:574-581.

comentada anteriormente, podría interferir en esta función del osteoclasto e inhibir de esta forma la reabsorción ósea⁶⁸.

Además, la melatonina ha demostrado promover la angiogénesis y favorecer la cicatrización de las heridas. Así, **Soybir y cols.**⁶⁹ en 2003 realizaron un estudio para evaluar el efecto de la melatonina sobre la angiogénesis y la cicatrización de las heridas en ratas a las que se les practicó una incisión y posteriormente se les administró una dosis de 0.4 mg/kg/rata al día de melatonina disuelta en 0.9% NaCl. Las biopsias se tomaron a los 3, 7, 10, 14 y 21 días tras la operación. El grupo tratado con melatonina mostró neovascularización y un aumento significativo de venas a todos los tiempos de estudio. Además, los niveles de hidroxiprolina (aminoácido que se encuentra fundamentalmente en el tejido óseo, formando el 10% de la molécula del colágeno) fueron también mayores en el grupo de estudio en comparación con el grupo control.

Ramírez Fernández y cols.¹⁰ en 2012 realizaron un estudio en conejos *New Zealand* donde rellenaron unas perforaciones con melatonina. Tras 4 semanas de estudio, las imágenes radiológicas mostraron una reparación ósea completa de las perforaciones rellenadas con melatonina. Además, encontraron que la hormona promovió la angiogénesis significativamente mejor que el grupo control. Esto indica que la melatonina mantiene la homeostasis capilar bajo condiciones normales. Se demostró también que había numerosas células mesenquimales de morfología irregular con amplio citoplasma y numerosos fibroblastos en una matriz de abundante sustancia fundamental, fibras de colágeno, macrófagos y linfocitos. En el grupo control, se observó que la angiogénesis mejoró de forma tiempo dependiente durante el proceso natural de cicatrización, mientras que la melatonina aceleró este proceso, remarcando su gran potencial de angiogénesis. Estos resultados confirman los derivados del

⁶⁸ Cardinali DP, Ladizesky MG, Boggio V, Cutrera RA, Mautalen C. Melatonin effects on bone: experimental facts and clinical perspectives. J Pineal Res 2003;34:81-87.

⁶⁹ Soybir G, Topuzlu C, Odabas O, Dolay K, Bilir A, Köksoy F. The effects of melatonin on angiogenesis and wound healing. Surg Today 2003;33:896-901.

estudio de **Pugazhenthi y cols.**⁷⁰ en 2008 quienes demostraron que la melatonina aumenta la formación de nuevos vasos así como los niveles de expresión de proteínas del factor de crecimiento del endotelio vascular durante la formación del tejido de granulación.

Por otro lado, se ha visto que la melatonina regenera el hueso alrededor de los implantes. En un estudio realizado por **Tresguerres y cols.**⁷¹ en 2010 en conejos *New Zealand*, se administró melatonina tópica alrededor de implantes. La evaluación histológica de las biopsias tomadas a las 4 semanas tras la cirugía muestra un incremento estadísticamente significativo del contacto implante hueso trabecular comparado con el grupo control lo que sugiere que la aplicación de melatonina local en el momento de la colocación del implante puede inducir la formación de hueso trabecular y mostrar mayor densidad ósea.

En un estudio realizado por **Calvo-Guirado y cols.**⁷² en 2010 donde se colocaron injertos en tibias de conejo, la melatonina regeneró la anchura y la altura del hueso cortical alrededor de los implantes más rápidamente que los controles.

Guardia y cols.⁹ en 2011 demostraron que la aplicación de melatonina tópica en el alveolo antes de colocar implantes actúa como agente biomimético a la 5ª y 8ª semana tras la cirugía.

Existen otros estudios que asocian la melatonina con otras sustancias, bien naturales o sintéticas. **Takechi y cols.⁸ en 2008 evaluaron los efectos de la melatonina combinada**

⁷⁰ Pugazhenthi K, Kapoor M, Clarkson AN, Hall I, Appleton I. Melatonin accelerates the process of wound repair in full-thickness incisional wounds. J Pineal Res 2008;44:387-396.

⁷¹ Tresguerres IF, Clemente C, Blanco L, Khraisat A, Tamimi F, Tresguerres JA. Effects of Local Melatonin Application on Implant Osseointegration. Clin Implant Dent Relat Res 2010 Apr 23. Doi: 10.1111/j.1708-8208.2010.00271.x.

⁷² Calvo-Guirado, Ramírez-Fernández MP, Gómez-Moreno G, Maté-Sánchez JE, Delgado-Ruiz R, Guardia J, López-Marí L, Barone A, Ortiz-Ruiz AJ, Martínez-González JM, Bravo LA. Melatonin stimulates the growth of new bone around implants in the tibia of rabbits. J Pineal Res 2010;49:356-363.

con FGF-2 sobre la capacidad de promover osteogénesis alrededor de implantes de titanio. Colocaron implantes de titanio en 24 ratas, al grupo de estudio se le administró melatonina intraperitoneal durante 4 semanas tras la cirugía y se le inyectó FGF-2 alrededor de los implantes 5 días después de la colocación de los mismos. El grupo control recibió suero salino únicamente. En el grupo experimental se observó hueso neoformado alrededor de los implantes, además, había hueso trabecular directamente conectado con hueso viejo cortical. Estos resultados sugieren que la melatonina y el FGF-2 promueven la oseointegración.

El grupo de investigación de **Calvo-Guirado y cols.** realizó dos investigaciones con el fin de estudiar el efecto de la melatonina junto con un biomaterial de origen porcino en la regeneración ósea. En 2009⁷³, colocaron implantes en mandíbulas de perros Beagle. Después de un periodo de cuatro semanas, los resultados demostraron que el grupo de implantes a los que se les aplicó melatonina tópica el día de la cirugía tenían una mayor formación de hueso nuevo, un mayor contacto implante hueso y una mayor densidad ósea comparado con el grupo control. Pero, a las 12 semanas, el grupo que consiguió mayor contacto implante hueso fue el que combinaba melatonina con hueso porcino, por lo que se concluyó que la melatonina mejora la osteointegración de los implantes. En 2010⁷⁴, los resultados que obtuvieron fueron similares. Se colocaron implantes en perros Beagle y se hicieron dos grupos para estudiar si existían diferencias en el contacto implante hueso entre implantes con hueso porcino y entre implantes con hueso porcino más melatonina. A las 12 semanas de estudio, los resultaros revelaron un mayor contacto implante hueso en el grupo tratado con

⁷³ Calvo-Guirado JL, Gómez-Moreno G, Barone A, Cutando A, Alcaraz-Baños M, Chiva F, López-Marí L, Guardia J. Melatonin plus porcine bone on discrete calcium deposit implant surface stimulates osteointegration in dental implants. J Pineal Res 2009;47:164-172.

⁷⁴ Calvo-Guirado JL, Gómez-Moreno G, López-Marí L, Guardia J, Marínez-González JM, Barone A, Tresguerres IF, Paredes SD, Fuentes-Breto L. Actions of melatonin mixed with collagenized porcine bone versus porcine bone only on osteointegration of dental implants. J Pineal Res 2010;48:194-203.

melatonina y hueso porcino. Reafirmando con este estudio los resultados que habían obtenido el año anterior.

En un estudio de 2012 de **Fernando-Muñoz y cols.**⁷⁵ realizado en perros Beagle se compara el efecto de la melatonina combinado con otra hormona, la hormona del crecimiento. Se extrajeron los premolares y molares superiores e inferiores y antes de la colocación de los implantes, los alveolos se rellenaron con una mezcla de melatonina y hormona del crecimiento. A las 2 semanas, el contacto implante hueso, el área ósea periimplantaria y el hueso interespira fueron significativamente mayores en el grupo de melatonina más hormona que en el grupo control. A la 5ª y 8ª semanas, el BIC y la densidad ósea fueron similares en ambos grupos. Estos resultados confirman que la melatonina y la hormona de crecimiento actúan de manera sinérgica, mejorando la formación de hueso nuevo en las primeras etapas de cicatrización.

Del mismo modo, los efectos de la melatonina en relación a la osteoporosis han sido estudiados por **Kotlarczyk y cols.**⁷⁶ en 2012. Éstos realizaron un estudio para evaluar los efectos de la melatonina en la salud ósea y en la calidad de vida de mujeres perimenopáusicas. A la vista de los resultados que obtuvieron, parece que la hormona puede restaurar los desequilibrios en el remodelado óseo, previniendo, de esta manera, la pérdida ósea, además de mejorar los síntomas asociados con la perimenopausia. Estos datos confirman los resultados obtenidos por **Egermann y cols.**⁷⁷ en 2011 que demostraron que la pinealectomía induce pérdida ósea.

⁷⁵ Muñoz F, López-Peña M, Miño N, Gómez-Moreno G, Guardia J, Cutando A. Topical Application of Melatonin and Growth Hormone Accelerates Bone Healing around Dental Implants in Dogs. Clin Implant Dent Relat Res 2012;14:226-235.

⁷⁶ Kotlarczyk MP, Lassila HC, O'Neil CK, D'Amico F, Enderby LT, Witt-Enderby PA, Balk JL. Melatonin osteoporosis prevention study (MOPS): a randomized, double-blind, placebo-controlled study examining the effects of melatonin on bone health and quality of life in perimenopausal women. J Pineal Res 2012;52:414-426.

⁷⁷ Egermann M, Gerhardt C, Barth A, Maestroni GJ, Schneider E, Alini M. Pinealectomy affects bone mineral density and structurean experimental study in sheep. BMC Musculoskelet Disord 2011;12:271.

Todos estos datos confirman un efecto osteogénico de la melatonina que puede ser clínicamente importante, ya que podría ser usada como potencial agente terapéutico en situaciones en las que sea deseable un aumento de la formación ósea, como cicatrización de fracturas u osteoporosis¹.

2. 3. 3. 4. Melatonina en procesos cancerígenos

El descenso en la producción de melatonina con la edad es considerado como uno de los mayores contribuyentes en el desarrollo de enfermedades neoplásicas. La melatonina, como hemos visto anteriormente, es un antioxidante natural con propiedades inmunopotenciadoras, ayudando a los linfocitos T colaboradores (linfocitos CD4) que juegan un papel importante en la protección contra la malignidad. La melatonina es efectiva en la supresión del crecimiento neoplásico en diferentes tumores, tales como el melanoma, el cáncer de mama y el de próstata, así como el cáncer de ovario y el colorrectal. Como terapia adyuvante, la melatonina puede ser beneficiosa para tratar a pacientes con cáncer de mama, carcinoma hepatocelular o melanoma⁷⁸.

La melatonina actúa como agente citoprotector ya que disminuye la toxicidad de la quimioterapia y/o radioterapia, mejorando la supervivencia de los pacientes y aminorando los efectos secundarios de la quimioterapia⁷⁹.

Además, se han vinculado ciertos tipos de cánceres en trabajadores de turno de noche y estilos de vida diferentes que producen un daño a la glándula pineal que forma la melatonina. A este proceso se lo ha llamado cronodisrupción del cáncer^{80,81}.

⁷⁸ Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Brzezinski A, Bhatnagar KP, Cardinali DP. Melatonin, immune function and cancer. Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov 2011;5:109-123.

⁷⁹ Seely D, Wu P, Fritz H, Kennedy DA, Tsui T, Seely AJ, Mills E. Melatonin as Adjuvant Cancer Care With and Without Chemotherapy: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Trials. Integr Cancer Ther 2011 Oct 21. Doi: 10.1177/1534735411425484.

2. 3. 3. 5. Hormona del sueño

La capacidad de la melatonina para promover el sueño ha sido estudiada durante muchos años. En particular, la melatonina parece ser una herramienta importante para combatir el insomnio en pacientes de mediana edad y mayores. Esto se debe, principalmente, a que la producción de melatonina disminuye con la edad por lo que un aporte exógeno de la hormona mejora la calidad y la duración del sueño⁸². Por otro lado, se ha observado que no produce ningún efecto rebote al suprimir el tratamiento ni aun después de doce meses de terapia continuada, además, el aporte exógeno de melatonina no disminuye la producción endógena de la misma⁸³.

Otros autores han estudiado el efecto terapéutico de la melatonina en el insomnio en pacientes con ciertas enfermedades, siendo igualmente efectiva. Así, en el estudio de **Mallow y cols.**⁸⁴ la melatonina demostró ser efectiva tras una semana de tratamiento en niños con autismo, mejorando la calidad y la cantidad de sueño, influyendo también en la mejora del comportamiento de los niños. Por otro lado, **Melamud y cols.**⁸⁵ a la vista de los resultados de su estudio concluyen que los trastornos del sueño y la fatiga que sufren muchos pacientes con esclerosis múltiple pueden ser debidos a anomalías

⁸⁰ Erren T.C. Light, timing of biological rhythms and chronodisruption in man. Naturwissenschaften 2003;90:485-494.

⁸¹ Dumont M, Lanctôt V, Cadieux-Viau R, Paquet J. Melatonin production and light exposure of rotating night workers. Chronobiol Int 2012;29:203-210.

⁸² Siegrist C, Benedetti C, Orlando A, Beltrán JM, Tuchscherr L, Noseda CM, Brusco LI, Cardinali DP. Lack of changes in serum prolactin, FSH, TSH, and estradiol after melatonin treatment in doses that improve sleep and reduce benzodiazepine consumption in sleep-disturbed, middle-aged, and elderly patients. J Pineal Res 2001;30:34-42.

⁸³ Lemoine P, Garfinkel D, Laundon M, Nir T, Zisapel N. Prolonged-release melatonin for insomnia - an open-label long-term study of efficacy, safety, and withdrawal. Ther Clin Risk Manag 2011;7:301-311.

⁸⁴ Mallow B, Adkins KW, McGrew SG, Wang L, Goldman SE, Fawkes D, Burnette C. Melatonin for Sleep in Children with Autism: A Controlled Trial Examining Dose, Tolerability, and Outcomes. J Autism Dev Disord 2012 Mar 9. Doi: 10.1007/s10803-011-1418-3.

⁸⁵ Melamud L, Golan D, Luboshitzky R, Lavi I, Miller A. Melatonin dysregulation, sleep disturbances and fatigue in multiple sclerosis. J Neurol Sci 2012;314:37-40.

en la secreción de melatonina por parte de estos pacientes que, parece ser influenciada por el tratamiento con interferón β .

2. 3. 3. 6. Melatonina y jet-lag

La melatonina es muy efectiva en la prevención, reducción y/o tratamiento del jet-lag⁸⁶. Su uso está especialmente recomendado en viajeros que vuelan a través de 5 ó más zonas horarias, sobre todo, si han experimentado jet-lag previamente. Los viajeros que cruzan de 2 a 4 zonas horarias pueden utilizarla también si la necesitan⁸⁷.

2. 3. 3. 7. Antidepresiva

Lewy y cols.⁸⁸ realizaron un estudio en pacientes que sufrían trastorno afectivo estacional o depresión invernal. Hicieron dos grupos, el primero fue tratado con dosis bajas de melatonina por la tarde y el segundo grupo con placebo. Los pacientes tratados con melatonina mostraron una reducción significa de los índices de depresión comparado con el grupo placebo.

2. 3. 3. 8. Estimuladora de la sexualidad

La inyección sistémica de pequeñas dosis de melatonina estimula la actividad sexual de las ratas machos. **Drago y Busa**⁸⁹ realizaron un experimento en el que demuestran que la administración sistémica aguda de la melatonina en pequeñas dosis

⁸⁶ Igaz P, Tulassay Z. Clinical picture and treatment of jet lag. Orv Hetil 2011;152:2021-2024.

⁸⁷ Herxheimer A, Petrie KJ. Melatonin for the prevention and treatment of jet lag. Cochrane Database Syst Rev 2002;CD001520.

⁸⁸ Lewy AJ, Bauer VK, Cutler NL, Sack RL. Melatonin treatment of winter depression: a pilot study. Psychiatry Res 1998;77:57-61.

⁸⁹ Drago F, Busa L. Acute low doses of melatonin restore full sexual activity in impotent male rats. Brain Res 2000;878:98-104.

(10-100 microgramos/kg) induce la aparición de la eyaculación en ratas macho impotentes. Este efecto fue parcialmente suprimido por la inyección simultánea periférica del antagonista de los receptores de la melatonina, el luzindol. Estos resultados sugieren que la melatonina puede estimular, de una manera dosisdependiente, varios parámetros de copulación de la conducta sexual masculina y puede restaurar la actividad sexual en los animales impotentes por la interacción con receptores cerebrales.

En otro estudio realizado en cabras, **Zarazaga y cols.**⁹⁰ concluyeron que la melatonina puede inducir la actividad reproductiva de estos animales sin necesidad de separar a los machos de las hembras, como se realiza habitualmente.

2. 3. 3. 9. Melatonina y cavidad oral

La melatonina llega a la cavidad oral a través de las glándulas salivales, donde se filtra desde la circulación general. La proporción de melatonina salival/melatonina plasmática en un patrón de 24 horas oscila entre 0.24 y 0.33, esto quiere decir que las concentraciones de melatonina en saliva están en torno al 24-33% de las que la hormona alcanza en plasma. Los autores coinciden en que aproximadamente el 70% de la melatonina plasmática está ligada a albúmina, por lo que esta melatonina ligada no aparecerá en saliva en cantidad apreciable. De este modo, la melatonina salival representa la proporción de melatonina circulante no ligada a albúmina, es decir, melatonina libre^{91,92}.

⁹⁰ Zarazaga LA, Gatica MC, Celi I, Guzmán JL, Malpaux B. Effect of melatonin implants on sexual activity in Mediterranean goat females without separation from males. Theriogenology 2009;72:910-918.

⁹¹ McIntyre IM, Norman TR, Burrows GD, Amstrong SM. Melatonin rhythm in human plasma and saliva. J Pineal Res 1987;4:177-183.

⁹² Vakkuri O. Diurnal rhythm of melatonin in human saliva. Acta Physiol Scand 2004;124:409-412.

A nivel de la cavidad oral se han realizado estudios principalmente sobre los efectos de la melatonina en el periodonto, el hueso y la respuesta inflamatoria después de las intervenciones quirúrgicas, además del efecto protector de la mucosa del tracto gastrointestinal.

La evidente relación entre radicales libres y algunos procesos orales, fundamentalmente la enfermedad periodontal, sugiere que la melatonina podría actuar disminuyendo el ataque oxidativo a los tejidos periodontales, reduciendo los niveles de peroxidación lipídica y otros marcadores oxidativos a nivel de la cavidad oral. Así lo confirman las revisiones realizadas por **Gómez-Moreno y cols.**⁹³ y **Cutando y cols.**⁹⁴ donde además, se demuestra que la melatonina puede contribuir a la regeneración ósea del alveolo a través de la estimulación de la producción de fibras de colágeno tipo I y de la modulación de la actividad de los osteoblastos y osteoclastos.

Naguib y cols.⁹⁵ también establecen una relación directa entre la enfermedad periodontal y los niveles de melatonina. Para valorar el estado periodontal se utilizó el índice periodontal comunitario (CPI) y los niveles de melatonina en plasma sanguíneo y saliva se determinaron mediante radioinmunoensayo. Los pacientes con enfermedad periodontal tenían niveles más bajos de melatonina en saliva y plasma por lo que se confirma el papel protector de la melatonina frente a la enfermedad periodontal.

La importancia de la melatonina como antioxidante a nivel oral depende de su efecto paralelo sobre el sistema inmune. En trabajos publicados por **Cutando y cols.**^{96,97} se ha

⁹³ Gómez-Moreno G, Guardia J, Ferrera MJ, Cutando A, Reiter RJ. Melatonin in diseases of the oral cavity. Oral Dis 2010;16:242-247.

⁹⁴ Cutando A, Gómez-Moreno G, Arana C, Acuña-Castroviejo D, Reiter RJ. Melatonin: potential functions in the oral cavity. J Periodontol 2007;78:1094-1102.

⁹⁵ Naguib M, Gottumukkala V, Goldstein P. Melatonin and anesthesia: A clinical Perspective. J Pineal Res 2007;42:12-21.

⁹⁶ Cutando A, Gómez-Moreno G, Villalba J, Ferrera MJ, Escames G, Acuña-Castroviejo D. Relationship between salivary melatonin levels and periodontal status in diabetic patients. J Pineal Res 2003;35:239-244.

comprobado que la melatonina ejerce también en la cavidad oral una acción reguladora sobre el sistema inmune. Así, en pacientes con CPI 3 y 4, con focos infecciosos asociados, se produce un aumento en el número de linfocitos T CD4 que guarda gran similitud con la curva de concentraciones de melatonina en plasma. De la misma forma, aumentan también los linfocitos CD8 conforme empeora el estado oral. Por tanto, un estado oral deficiente (con índices CPI elevados) podría ser un factor de estimulación que actuara sobre la melatonina, la cual ejerce una acción impulsora sobre los linfocitos T CD4.

Asimismo, la melatonina a nivel del trato gastrointestinal protege a la mucosa del efecto de irritantes y ayuda a la cicatrización de las lesiones de tipo mucositis, esofagitis y úlcera péptica en el resto de tracto³⁶.

⁹⁷ Cutando A, Gómez-Moreno G, Galindo P, Arana C, Bolaños MJ, Acuña-Castroviejo D, Wang HL. Relationship between salivary melatonin and severity of periodontal disease. J Periodontol 2006;77:1533-1538.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

El objetivo general de nuestro estudio fue valorar la influencia de diferentes dosis de melatonina en el proceso de diferenciación de células madre multipotenciales adultas en células de estirpe osteoblástica.

Los objetivos específicos fueron:

- Determinar la densidad óptima de cultivo utilizando diferentes inóculos (1000, 1500, 2000 células por pocillo).
- 2. Valorar la diferenciación celular de las células madre con la dosis fisiológica de melatonina (0.01 μm), así como valorar la influencia de diferentes dosis terapéuticas (50 μm, 100 μm y 150 μm) de melatonina y dexametasona (100 μM) mediante el ensayo de proliferación celular, la citometría, la determinación de la producción de fosfatasa alcalina, la determinación de osteogénesis y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Así mismo, las células fueron observadas bajo microscopía óptica de contraste de fases y bajo microscopía electrónica de barrido para estudiar posibles cambios en su morfología.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4. 1. Aislamiento y cultivo de células madre mesenquimales

Para este estudio, se utilizaron células madre mesenquimales adultas humanas (CMM-*ah*) con el fin de evaluar el efecto de la melatonina en la proliferación celular y en la habilidad para promover la diferenciación osteoblástica. Las CMM-*ah* fueron aisladas a partir de la médula ósea obtenida por aspiración directa percutánea de la cresta ilíaca (50 mL/paciente) de tres varones voluntarios de entre 27 a 35 años que contaban con un buen estado general de salud, y que iban a ser intervenidos quirúrgicamente por hernia discal (2 pacientes) y necrosis avascular de la cabeza del fémur como consecuencia de una luxación posterior de cadera (1 paciente). En todos los casos se obtuvo previamente el correspondiente consentimiento informado. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de nuestra institución (Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia).

La médula ósea aspirada fue transferida a un tubo estéril que contenía heparina sódica (20 U mL⁻¹ de volumen aspirado). La fracción celular mononuclear se obtuvo del *fuffy coat* mediante gradiente de densidad por centrifugación con Ficoll en un dispositivo cerrado automatizado (SEPAXTM (Biosafe, Eysines, Suiza)). Después de estimar la viabilidad y el número de células mediante una tinción vital (azul tripán) utilizando una cámara de Neubauer, las células fueron sembradas en frascos de cultivo de 75 cm² (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania) con 10 mL de medio de crecimiento (MC) y se incubaron a 37° C con 5% de CO₂ y una humedad relativa del 95% sin perturbaciones durante 7 días (Figura b). Después, el medio fue cambiado cada 3-4 días.

El MC usado fue α -Minimum Essential Medium (α -MEM) (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EEUU) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Sigma-Aldrich) y penicilina y estreptomicina (100 U mL⁻¹ and 100 µg mL⁻¹, respectivamente) (Sigma-Aldrich).

46



Figura 11. Incubador Steri-Cult 200 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EEUU).

Después de 7 días, se cambió el MC, eliminando las células hematopoyéticas que no se habían adherido, seleccionando, de esta manera, las CMM-*ah* dada su capacidad de adhesión al plástico de los frascos de cultivo en condiciones de cultivo estándar¹⁵. Cuando el cultivo celular alcanzó la confluencia (80-85%) (pase 0, PO), las células fueron subcultivadas en una proporción 1:3, separándolas del frasco de cultivo con tripsina/EDTA (0.25%/0.25%) diluidas en tampón fosfato salino (PBS, pH 7.4) durante 5 minutos. Para obtener homogeneidad de la muestra y reducir la variabilidad entre los donantes, todas las células de primer subcultivo (pase 1, P1) fueron reagrupadas y subcultivadas en frascos de 175 cm² para su crecimiento y así obtener un número suficiente de células para el estudio en pase 3 (P3). El medio de crecimiento fue cambiado dos veces por semana.

4. 2. Identificación de las células aisladas

Con el fin de confirmar la identidad de las células aisladas del cultivo primario como CMM-*ah* se tuvieron en cuenta los criterios de la I.S.C.T que establece la presencia de los antígenos de superficie (CD en inglés *cluster of differentiation):* CD73, CD90 y CD105 y la ausencia de marcadores hematopoyéticos CD34 y CD45.

La identificación de las células se realizó con la citometría de flujo que es una técnica de análisis celular que implica medir las características de dispersión de luz y fluorescencia que poseen las células conforme se las hace pasar por delante de un haz de láser focalizado. Las señales producidas por la interacción de las células con el haz de luz son de dos tipos, señales de dispersión (relacionadas con el tamaño y la complejidad celular) y señales de fluorescencia. Los citómetros de flujo permiten detectar señales de fluorescencia procedentes del complejo antígeno/anticuerpo marcado con un fluorocromo y situado en una célula, siendo la cantidad de señal de fluorescencia emitida proporcional a la cantidad de componentes fluorescentes de la célula (Figura 12).



Figura 12. Esquema ilustrativo del funcionamiento de un citómetro (www.invitrogen.com).

Para proceder al ensayo, se separaron las células del plástico del frasco de cultivo con tripsina/EDTA (0.25%/0.25%) y se centrifugaron durante 10 minutos a 1000 rpm. Pasados esos 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en PBS para proceder a su marcaje mediante la técnica de inmunofluorescencia directa. A la muestra se le añadió 1 µL de los anticuerpos monoclonales. Tras mezclar bien las células y los anticuerpos, se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido ese tiempo, se eliminó el exceso de anticuerpo lavando las células con PBS y se centrifugaron durante 5 minutos a 200 g. Finalmente, se retiró el sobrenadante y se añadió 0.2 mL de PBS y la muestra se almacenó a 4° C y en la oscuridad, hasta el momento de su adquisición en el citómetro de flujo, que en ningún caso, superó una hora desde el término del proceso de marcaje.

Los anticuerpos específicos monoclonales de ratón, empleados a una concentración de 2,5 mg/mL, fueron: CD34 PE/clon 581, CD45 FITC/clon HI30, CD73 PE/clon AD2, CD90 APC/clon 5E10 y CD105 FITC/clon 266 (Becton Dickinson). Para los controles de isotipos se emplearon inmunoglobulinas antiratón IgG1 k marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), IgG1 K marcado con ficoeritrina (PE) y IgG1 k marcado con aloficocianina (APC) (Becton Dickinson).

Las muestras fueron adquiridas en un citómetro de flujo modelo FACSort (Becton Dickinson) (Figura 13) y analizadas con el programa CellQuest, calculando la media geométrica de la distribución de fluorescencia para cada fluorocromo.

49



Figura 13. Citómetro de flujo modelo FACSort (Becton Dickinson).

4. 3. Diseño experimental del estudio

Una vez confirmada la identidad de las células aisladas, decidimos determinar la acción de la melatonina (a concentraciones fisiológicas (0.01 μ M) y farmacológicas (50 μ M, 100 μ M y 150 μ M)) y de la dexametasona (100 μ M) sobre el cultivo primario de CMM-*ah* en cuanto a la proliferación celular y a la capacidad de inducir diferenciación a células con fenotipo osteoblástico.

Para llevar a cabo el estudio se establecieron seis grupos:

| Grupol | Control: CMM-ah sin tratamiento (MC) | | | | | |
|-----------|---|--|--|--|--|--|
| Grupo II | CMM-ah expuestas a melatonina 0,01 μM (MC+0,01 μM) | | | | | |
| Grupo III | СММ-ah expuestas a melatonina 50 µМ (MC+50 µМ) | | | | | |
| Grupo IV | CMM- ah expuestas a melatonina 100 μ M (MC+100 μ M) | | | | | |
| Grupo V | CMM- <i>ah</i> expuestas a melatonina 150 µM (MC+150 µM) | | | | | |
| Grupo VI | CMM-ah en medio osteogénico (MO) (dexametasona 100 µM) | | | | | |

Tabla 2. Grupos de estudio

El MC utilizado fue α -MEM (Sigma-AldrichTM, San Luis, Misuri, EEUU) suplementado con 10% de FBS (Sigma-AldrichTM) y penicilina y estreptomicina (100 U mL⁻¹ y 100 µg mL⁻¹, respectivamente) (Sigma-AldrichTM) y el MO consistía en MC suplementado con ácido ascórbico (0.2 mM; Sigma-AldrichTM), dexametasona (100 µM; Sigma-AldrichTM) y β -glicerofosfato (10 nM; Sigma-AldrichTM) (Figura 14).

La melatonina también se adquirió a Sigma-Aldrich[™] (Figura 15).



Figura 14. Componentes del medio osteogénico (Sigma-Aldrich[™]).



Figura 15. Polvo de Melatonina (Sigma-AldrichTM).

Las condiciones experimentales de cultivo fueron las mimas para todos los grupos: las células se incubaron a 37° C con 5% de CO_2 y una humedad relativa del 95% sin perturbaciones. Los medios fueron cambiados cada 3-4 días.

Se realizaron diversas pruebas:

- Ensayo de proliferación celular. Se utilizó el MTT (Bromuro de 3-(4,5dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) con el fin de determinar si las diferentes concentraciones de melatonina y la dexametasona influyen en la proliferación de las CMM-*ah*.
- Microscopio óptico de contraste de fases. Se observaron las CMM-ah con microscopio óptico para registrar la evolución de los cultivos, así como los cambios en sus características morfológicas y el crecimiento bajo los efectos de las diferentes concentraciones de melatonina y dexametasona.
- Microscopio Electrónico de Barrido (MEB). Se observaron los cultivos con MEB para evaluar la morfología, la adhesión celular y el crecimiento de las CMM-ah cultivadas con diferentes concentraciones de melatonina y dexametasona.
- Microanálisis espectroscópico. Se realizó para determinar la naturaleza (elementos químicos) de los nódulos observados con MEB.
- Citometría de flujo. A través de la citometría evaluamos los marcadores de superficie, determinando si hubo cambios en la expresión de los mismos.
- Determinación de la producción de fosfatasa alcalina. Esta enzima es un marcador de diferenciación osteoblástica.
- Determinación de osteogénesis. Realizamos la tinción con rojo de alizarina para detectar la presencia de mineralización como indicador de la diferenciación osteogénica de las CMM-ah.
- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Se realizó para estudiar la expresión del gen OCT-4 (se expresa en células madre embrionarias, por lo que es marcador de células indiferenciadas), de la osteocalcina (marcador de actividad de los osteoblastos y, por lo tanto, de formación ósea) y del

colágeno tipo I (sintetizado por osteoblastos, por lo que indicaría diferenciación celular).

Todos los ensayos se realizaron, al menos, por triplicado. Los periodos de estudio para cada ensayo se establecieron basándonos en los resultados observados en estudios piloto previos.

4. 3. 1. Ensayo de proliferación celular (MTT)

El efecto continuo de las diferentes concentraciones de melatonina y dexametasona sobre el crecimiento de las CMM-*ah* fue evaluado a través del test del MTT (Sigma-Aldrich Química, Madrid, España). Este ensayo se basa en la reducción celular del MTT realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto medible colorimétricamente (color azul), denominado sal de formazán, permitiendo determinar la actividad mitocondrial de las células tratadas. Esta sal es un compuesto insoluble en medio acuoso pero soluble en dimetil sulfóxido (DMSO) y es utilizado para medir supervivencia y proliferación celular pues la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Este método fue desarrollado por **Mosmann**⁹⁸ en 1983 siendo modificado en 1986 por **Denizot y Lang**⁹⁹.

Para determinar la acción de la melatonina sobre el cultivo primario de CMM-*ah* en cuanto a la proliferación celular se establecieron como periodos de estudio los 3, 7, 14, 21 y 28 días de incubación. La exposición de las CMM-*ah* a la acción de las diferentes concentraciones de melatonina y dexametasona fue continuado desde los primeros momentos del estudio.

⁹⁸ Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983;65:55-63.

⁹⁹ Denizot F, Lang R. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J Immunol Methods 1986;89:271-277.

Se sembraron tres series de placas de 96 pocillos a densidades de 1.0×10^3 , $1.5 \times 10^3 \text{ y}$ 2.0 x 10^3 células/pocillo, respectivamente. En cada una de ellas, se sembraron seis replicados de los seis grupos descritos previamente. La distribución de cada una de las placas fue de la siguiente manera (Figura 16):

| 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | | |
|------|-----------|-----------|----------------|-----------|-----------|--|--|
| 50 | <u>50</u> | 50 | <mark>.</mark> | <u>50</u> | 50 | | |
| | 100 | 100 | 100 | 100 | | | |
| 150 | 150 | 150 | 150 | 150 | 150 | | |
| dex | dex | dex | dex | dex | dex | | |
| | | | | | | | |
| в | в | в | в | в | в | | |
| | | | | | | | |

Figura 16. Distribución de los pocillos en el ensayo del MTT.

A los tiempos de estudio establecidos, se disolvió el MTT en α -MEM sin rojo fenol ni SFB precalentado a 37° C hasta obtener una disolución de 5 mg/mL. Seguidamente se filtró a través de un filtro de 0.22 μ m para esterilizar la disolución y eliminar los residuos insolubles.

El MC de todos los pocillos fue reemplazado por 200 μ L de medio fresco sin rojo fenol y se añadió 50 μ L de la disolución de MTT, de este modo, el MTT quedó a una concentración final de 1mg/mL en el medio de cultivo. Las placas se incubaron en la oscuridad durante 4 horas en una atmósfera del 95% de humedad con 5% de CO₂ a 37° C. Después, se retiró el medio de cada pocillo para eliminar el MTT sin metabolizar y la cantidad de formazán producida fue solubilizada añadiendo 100 μ L de DMSO a cada pocillo. Posteriormente, se agitó la placa durante 5 minutos (para completar el proceso de disolución) a temperatura ambiente y protegida de la luz. Por último se midió la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm en un espectrofotómetro FLUOstar Galaxy (BMG Labtech, Offenburg, Alemania), tomando como referencia una longitud de onda de 690 nm. Los resultados se expresan como valores de densidad óptica.

4. 3. 2. Observaciones con microscopía óptica de contraste de fases

Las CMM-*ah* fueron observadas con un microscopio óptico de contraste de fases (Nikon modelo Eclipse TE2000 U) (Figura 17), registrando la evolución de los cultivos, así como los cambios en sus características morfológicas y el crecimiento bajo los efectos de las diferentes concentraciones de melatonina y dexametasona. Las observaciones se realizaron a los 3, 7, 14 y 21 días ya que, una vez alcanzada la confluencia, apenas se producen cambios en los cultivos.



Figura 17. Microscopio óptico de contraste de fases (Nikon modelo Eclipse TE2000 U).

4. 3. 3. Estudio ultraestructural mediante microscopía electrónica de barrido

Para el análisis mediante MEB, se sembraron 3.0×10^3 células/cm² en portaobjetos de 2 pocillos (4,2 cm²) y cultivadas a diferentes tiempos (3, 7, 14, y 21 días). A los tiempos establecidos, se lavaron las células con PBS y se fijaron con glutaraldehído al 3% en tampón de cacodilato de sodio a 0.1 M (pH 7.2 – 7.4) durante una hora a 4° C. Después, se volvieron a lavar y se postfijaron con tetróxido de osmio durante una hora antes de ser deshidratadas mediante pases sucesivos en etanol en graduaciones crecientes (30, 50, 70, 90 vol. %), con una deshidratación final en alcohol absoluto. Seguidamente, se secaron las muestras por el método del punto crítico en un baño de acetona al 100% y CO₂ en una cámara (Balzers Union CPDO2). Finalmente, se recubrieron con una capa de oro (200 Å de grosor) en un vaporizador (Bio-Rad Polaron Division). Las preparaciones se observaron con MEB (JSM-6100, Jeol, Tokio, Japón) (Figura 18) con una aceleración de 15 a 20 kV.



Figura 18. Imagen de microscopio electrónico de barrido modelo JSM-6100 (Jeol).

4.3.4. Microanálisis espectroscópico

Para determinar la naturaleza (elementos químicos) de los que estaban compuestos los nódulos observados con MEB, en cultivos expuestos a la acción de la melatonina (0.01 μ M, 50 μ M, 100 μ M y 150 μ M) y de la dexametasona, se procesaron las muestras de forma similar a la descripción dada en la sección 3.3. y se cubrieron con carbón. Para el microanálisis espectroscópico se utilizó un MEB EDS INCA (Oxford Instruments, Oxfordshire, Reino Unido).

4. 3. 5. Citometría de flujo

La citometría de flujo se realizó para determinar los cambios fenotípicos en la expresión de marcadores de superficie de las células utilizadas en el estudio, antes y después de su exposición a las distintas concentraciones de melatonina y dexametasona. La pérdida de la expresión de los marcadores de membrana CD73, CD90 y CD105 nos indica que las CMM-*ah* están en proceso de diferenciación a osteoblastos, ya que éstos carecen de esos marcadores de membrana.

Se sembraron 3 frascos de 25 cm² (a una densidad de 3.0×10^3 células/cm²) por grupo y por periodo de estudio (3, 7, 14 y 21 días). En los tiempos establecidos, las muestras se procesaron según se ha descrito en el apartado 2.

La determinación de los valores medios de fluorescencia para cada antígeno de superficie, se realizó para cada uno de los distintos pases de cultivo de la muestra, manteniendo fijos los parámetros de adquisición del citómetro.

4. 3. 6. Determinación de la producción de fosfatasa alcalina

Para la determinación de la producción de fosfatasa alcalina se utilizó un kit comercial de ensayo cuantitativo (Quantitative Alkaline Phosphatase ES



Characterization Kit SCR 066, Millipore, Billerica, MA, EEUU) (Figura 19).

Figura 19. Kit cuantitativo de fosfatasa alcalina (Millipore, Billerica, MA, EEUU).

La fosfatasa alcalina es una enzima hidrolasa que en condiciones alcalinas (pH>10) puede catalizar la hidrólisis de p-nitrofenil fosfato (p-NPP) a fosfato y pnitrofenol, de color amarillo. La cantidad de p-nitrofenol producido es proporcional a la cantidad de fosfatasa alcalina presente en la reacción.

Para determinar la producción de fosfatasa alcalina, se cultivaron células a densidad de 3 x 10^3 células/cm² en placas de 12 pocillos bajo las diferentes concentraciones de melatonina y dexametasona. A los tiempos de estudio fijados (14, 21 y 28 días) se retiró el medio de los cultivos, se lavaron las células con PBS, se separaron del plástico y se pusieron en un tubo cónico de 15 mL que se centrifugó a 220 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. El *pellet* se resuspendió en 2 mL de solución de lavado y se contaron las células en una cámara de recuento automático (TC 10TM. Automated Cell Counter, BioRad). Cada muestra se realizó por triplicado con 20000 células por ensayo. Se centrifugaron los tubos a 220 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. El *pellet* placa de 96. Se realizó una curva estándar de 8 puntos a través de una serie de diluciones de la fosfatasa alcalina estándar (Figura 20).



Figura 20. Imagen que muestra la curva estándar.

Una vez transferidas todas las muestras por triplicado a la placa de 96 pocillos, se añadió 50 µL de 2X p-NPP solución substrato a todos los pocillos (incluidos los de la curva estándar). Se incubó la placa en la oscuridad a temperatura ambiente durante 20 minutos. Finalmente, se añadió 50 µL de solución de parada a cada pocillo. La placa se leyó en un espectrofotómetro a 405 nm (FLUOstar Galaxy, BMG Labtech) (Figura 21).



Figura 21. Espectrofotómetro FLUOstar Galaxy (BMG Labtech).
4. 3. 7. Determinación de osteogénesis

Se evaluó la presencia de depósitos de calcio (nódulos de mineralización) en los cultivos a través de la unión selectiva del rojo de alizarina a las sales de calcio, de acuerdo al protocolo del fabricante (Osteogenesis kit assay, Millipore) (Figura 22).



Figura 22. Imagen que muestra el kit de osteogénesis (Millipore).

Se cultivaron células con las diferentes concentraciones de melatonina y dexametasona a una densidad de 3000 células/cm² en placas de 12 pocillos. A los 21 y 28 días de cultivo, se lavaron las muestras tres veces con PBS, se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente, y luego se tiñeron con Solución Rojo Alizarina durante 30 minutos. Después de un lavado abundante con agua destilada, se visualizaron las áreas teñidas con un microscopio óptico de contraste de fases (Nikon Eclipse TE 2000-U). Los depósitos minerales adquieren un color rojo brillante por la Solución Rojo Alizarina.

4. 3. 8. PCR clásica y PCR cuantitativa o en tiempo real

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*; Mullis, 1983) consiste en la amplificación de una cantidad de ADN mediante una reacción química catalizada por la enzima termoestable Taq polimerasa, procedente de la bacteria *Thermus aquaticus*. La mezcla de ADN complementario (ADNc), Taq polimerasa, cebadores, nucleótidos y tampón necesarios para la reacción, se somete a cambios de temperatura muy rápidos durante tiempos determinados, gracias a la utilización de un termociclador. Básicamente, hay tres fases que se repiten un número de veces o ciclos.

- Desnaturalización: se separan las dos cadenas que forman la doble hélice del ADN, entre 94-95° C.
- Hibridación: los cebadores se anclan en su región complementaria del ADN molde, entre 35-65° C, según las características del cebador.
- Extensión: elongación de la nueva cadena, a 72° C.

Se realizaron PCR clásicas para verificar que todas las muestras contenían ADN y su calidad, es decir, para verificar el éxito de la extracción del ARN y la copia del mismo a ADNc. El gen utilizado fue el de la β-actina ya que es un gen ubicuitario.

Se sembraron 3.0 x 10^3 células/cm² en frascos de 75 cm² y se cultivaron en presencia de las diferentes concentraciones de melatonina (0.01 µM, 50 µM, 100 µM y 150 µM) y también en medio osteogénico (dexametasona 10 µM) durante 3, 7, 14, 21 y 28 días. El ARN total fue aislado usando el RNeasy mini kit^m (Qiagen Ibérica S.L., Madrid, España) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se retrotranscribió 1 µg de ARN de cada muestra a ADNc usando El kit iScript^m de (Bio-Rad Laboratories, Madrid, España) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Para la amplificación, se utilizó 1 μ L de ADNc en un volumen final de reacción de 25 μ L. El mix de reacción contenía: 2 μ L de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs: dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 0.2 mM, 2 μ L de la mezcla de los dos cebadores 0.2 μ M, 2.5 μ L de Cl₂Mg 2.5 mM, 0.5 μ L de Taq polimerasa (Qiagen), 5 μ L de buffer y 12 μ L de H₂O para completar el volumen de 25 μ L.

La reacción se llevó a cabo utilizando el termociclador PTC-100 (MJ Research, EEUU) con el siguiente programa: 8 minutos a 95° C, 4 minutos a 94° C, seguidos de 45 ciclos de 3 minutos a 94° C, 58° C y 72° C.

El producto amplificado fue sometido a separación electroforética en gel de agarosa al 0.8% en TBE 0.5X y, a continuación, teñido con gel-red (Labnet Biotecnica, Madrid, España). Los fragmentos se visualizaron en un transiluminador de rayos UV con cámara fotográfica acoplada modelo Gel DocTM EZ System (BioRad).

Para la cuantificación de los genes relacionados con la diferenciación osteogénica, se utilizó la PCR cuantitativa ya que la PCR tradicional es menos precisa debido a que la cuantificación se realiza en la fase final (Plateau), mientras que la PCR cuantitativa nos permite tomar los datos durante la fase lineal (exponencial) de la amplificación, igual para todas las muestras y por eso comparable entre muestras. El producto de PCR es marcado con un fluorocromo que emite señal sólo cuando se intercala en la doble hélice del ADN, así que la cantidad de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de producto y al análisis de datos.

Los cebadores específicos para nuestros genes fueron elegidos entre los validados de Geneglobe (Qiagen). Los cebadores fueron testados para comprobar su eficiencia antes de empezar el análisis de las muestras; fueron utilizadas 4 diluciones de ADNc: 1/10, 1/50, 1/100, 1/500. La expresión fue cuantificada usando el termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen) (Figura 23) utilizando SYBR green master mix kit (Takara Bio INC. Shiga, Japón) siguiendo las instrucciones del fabricante.



Figura 23. Termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen). (www.qiagen.com).

El programa utilizado en el termociclador fue el siguiente: 3 minutos de desnaturalización a 95° C, y para la amplificación 40 ciclos de 95° C 10 segundos y 60° C 34 segundos. Se realizó una curva de fusión para asegurarnos de que todas las reacciones objeto de estudio estaban representadas por un solo pico, o sea un solo producto, indicando especificidad (la rampa de fusión va desde 70° C hasta 95° C). Cada muestra se leyó en triplicado. El análisis de los datos se realizó con el programa Rotor-Gene software (Qiagen). Para llevar a cabo la cuantificación de la expresión genética de las muestras se utilizó la técnica de la cuantificación relativa. Este método se utiliza para obtener la magnitud de los cambios fisiológicos en los niveles de expresión de los genes de interés en comparación con un gen de referencia¹⁰⁰, en nuestro caso el gen GAPDH. La expresión de este gen de referencia debe ser constante en las condiciones del ensayo. Para la cuantificación de los valores se aplicó la fórmula: $2^{-\Delta C}_{T}$ del método 2 delta-delta C_T que expresa la diferencia entre el valor C_T del gen de

¹⁰⁰ Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. Biotechnol Lett 2004;26:509-515.

estudio y el valor C_T del correspondiente control endógeno de referencia GAPDH.

Se evaluó la expresión de los genes del Colágeno tipo I (COL1A1), de la Osteocalcina (BGLAP), del Octamer Binding Protein 4 (OCT-4) y del Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (gen de referencia). Las secuencias de los cebadores empleadas aparecen en la Tabla 2.

| Nombre del gen | Símbolo del gen | Longitud del amplicon (bp) | ID Test |
|---|-----------------|----------------------------|----------------|
| Osteocalcina | BGLAP | 90 bp | Hs_BGLAP_1_SG |
| Octamer Binding Protein 4 | Oct-4 | 77 bp | Hs_POU5F1_1_SG |
| Colágeno tipo I | COL1A1 | 118 bp | Hs_COL1A1_1_SG |
| Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa | GADPH | 95 bp | Hs_GAPDH_1_SG |

Tabla 3. Genes utilizados en la PCR cuantitativa.

4. 3. 9. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos de los datos obtenidos se realizó mediante el programa informático SPSS v.18. (IBM SPSS statistic software, Nueva York, EEUU). Las variables continuas se han descrito mediante la media, mediana, la desviación típica y el intervalo de confianza al 95%. Esta descripción se realizó para la muestra total y estratificado por densidad celular (1000, 1500 y 2000 células). Las condiciones de aplicación de los análisis estadísticos se verificaron previamente a los mismos. La normalidad se contrastó mediante el test de Kolmogorov – Smirnoff y la homocedasticidad mediante la prueba de Levene. En caso de incumplimiento de alguna de las condiciones se procedió al análisis mediante pruebas no paramétricas. En las curvas de crecimiento para comparar los valores medios de crecimiento en los distintos cultivos celulares (1000, 1500 y 2000 células) se realizaron comparaciones de

ANOVA y se utilizó el test post-hoc de Bonferroni para corregir las comparaciones múltiples en caso de normalidad y pruebas no paramétricas Kruskal-Wallis en caso contrario. La evolución del crecimiento se analizó mediante pruebas paramétricas (T-Student para medidas repetidas o ANOVA para medidas repetidas) o no paramétricas (Wilcoxon o Friedman) según características propias de las variables en estudio. Para los casos en los que las varianzas no eran iguales se aplicaron pruebas robustas de igualdad de las medias (Test de Welch y Test de Brown-Forsythe). En el conjunto de pruebas estadísticas, el nivel de significación utilizado fue p<0,05.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5. 1. Aislamiento y cultivo de células madre mesenquimales

Se expandieron las células aisladas de todas las muestras procedentes de la cresta ilíaca de tres varones. Desde el punto de vista morfológico, se comprobó que las CMM-*ah* presentaban su aspecto habitual y proliferaban formando colonias que se expandían por toda la superficie del frasco. En las primeras horas de cultivo (Figura 24 A), podía observarse células sanguíneas no adherentes junto a unas pocas células de mayor tamaño y de aspecto redondeado o ligeramente alargado y de citoplasma poco contrastado adheridas al plástico. A los 7 días, las células adheridas mostraban un aspecto alargado, típico de las CMM-*ah* (Figura 24 B).



А

В

Figura 24 A. Células madre hematopoyéticas y CMM-*ah a* los 3 días de cultivo (10X). Figura 24 B. Células madre hematopoyéticas y CMM-*ah a* los 7 días de cultivo (10X).

Después de 7 días, se cambió el MC (Figura 25 A), eliminando las células hematopoyéticas que no se habían adherido a la superficie del plástico. Cuando el cultivo celular alcanzó la confluencia, se subcultivaron (Figura 25 B).



Figura 25 A. Imagen del cultivo a los 7 días una vez renovado el medio (10X). Figura 25 B. Cultivo confluente, en este punto fue cuando se realizó el subcultivo (10X).

Para obtener homogeneidad de la muestra y reducir la variabilidad entre los donantes, todas las células de primer subcultivo fueron reagrupadas y subcultivadas para su crecimiento y así obtener un número suficiente de células para el estudio en pase 3.

5. 2. Identificación de las células aisladas

Con el fin de comprobar si las células aisladas del cultivo primario cumplían los criterios mínimos establecidos por la I.S.C.T para definir una célula como CMM realizamos un estudio inmunofenotípico. Así, las células expresaban CD105, CD73 y CD90 (marcados con FITC, PE y APC respectivamente) (Figuras 26 A y B y 27 A y B) y carecían de los marcadores de línea hematopoyética CD34 y CD45 (Figuras 28 y 29 A y B).



Figura 26 A. Población de estudio. Representada como el tamaño frente a la complejidad de la célula. Figura 26 B. Las células fueron positivas para el marcador CD105.



Figura 27 A. Las células fueron positivas para el marcador CD73. Figura 27 B. Las células fueron positivas para el marcador CD90.



Figura 28. Población de estudio. Representada como el tamaño frente a la complejidad de la célula.



Figura 29 A. Las células fueron negativas para el marcador CD45. Figura 29 B. Las células fueron negativas para el marcador CD34.

5. 3. Ensayo de proliferación celular

En el estudio comparativo para determinar las diferencias entre las distintas densidades de siembra o inóculos (1000, 1500, y 2000 células/pocillo) en los diferentes periodos de estudio, la siembra que mostró una cinética de crecimiento más elevada

fue la de 1500 células/pocillo. Encontrando diferencias significativas entre el grupo de 1500 células/pocillo y el grupo de 1000 células/pocillo. Para este contraste de medias hemos utilizado el test de Kruskal-Wallis para un nivel de significación *p*<0,05. (Tablas 3, 4 y 5 y Gráficos 1, 2 y 3). La concentración de melatonina 100 µM produjo resultados estadísticamente significativos en todas las siembras, en los cultivos con 1000 células/pocillo, fue el grupo que mostró niveles más altos de absorbancia a los 14 y 28 días, en los cultivos con 1500 células/pocillo los resultados fueron significativos a los 7 y 14 días y en los cultivos con 2000 células/pocillo a los 28 días.

Si analizamos los datos desde un punto de vista general, observamos que la melatonina no produce inhibición alguna de la proliferación de las células madre ya que aumenta, en mayor o menor medida, el número de células a los 28 días de continuo tratamiento. En la siembra de 1000 células/pocillo los grupos cultivados con melatonina muestran niveles superiores de absorbancia a los 28 días cuando se comparan con los grupos control y con el grupo tratado con dexametasona. Lo mismo ocurre en los cultivos con densidades de 1500 y 2000 células/pocillo.

| | 3 días | 7 días | 14 días | 21 días | 28 días |
|--------------|-----------|-----------|-------------------------|-----------|-------------------------|
| Control | 0,08±0,01 | 0,12±0,05 | 0,37±0,09 | 1,22±0,09 | 1,45±0,18 |
| 0,01 μΜ | 0,07±0,02 | 0,16±0,06 | 0,38±0,08 | 1,75±0,20 | 1,82±0,07 |
| 50 μM | 0,06±0,01 | 0,11±0,02 | 0,36±0,07 | 1,81±0,12 | 1,97±0,16 |
| 100 μM | 0,09±0,02 | 0,29±0,03 | <mark>1,40±0,08*</mark> | 1,99±0,14 | <mark>2,31±0,17*</mark> |
| 150 μΜ | 0,10±0,03 | 0,23±0,04 | 0,60±0,11 | 1,91±0,10 | 2,03±0,25 |
| Dexametasona | 0,01±0,01 | 0,13±0,02 | 0,38±0,09 | 0,97±0,02 | 1,62±0,06 |

Tabla 4. Absorbancia en los diferentes cultivos con 1000 células/pocillo. Expresada en media±SD. (*p<0,05).



Gráfico 1. Evolución de los diferentes cultivos a densidad 1000 células/pocillo a lo largo del tiempo.

| | | 1 | | 1 | I |
|--------------|-----------|-------------------------|-------------------------|-----------|-----------|
| | 3 días | 7 días | 14 días | 21 días | 28 días |
| | | | | | |
| Control | 0,16±0,01 | 0,64±0,03 | 0,95±0,04 | 2,11±0,33 | 2,36±0,08 |
| 0,01 μM | 0,26±0,02 | 0,67±0,05 | 1,10±0,02 | 2,19±0,22 | 2,43±0,09 |
| 50 μM | 0,30±0,01 | 0,80±0,01 | 0,99±0,04 | 2,39±0,05 | 2,61±0,03 |
| 100 μM | 0,28±0,06 | <mark>0,97±0,06*</mark> | <mark>1,37±0,06*</mark> | 2,47±0,04 | 2,79±0,21 |
| 150 μΜ | 0,33±0,02 | 0,73±0,04 | 0,94±0,05 | 1,97±0,26 | 2,29±0,14 |
| Dexametasona | 0,17±0,01 | 0,65±0,02 | 0,96±0,04 | 1,99±0,21 | 2,01±0,20 |

Tabla 5. Absorbancia en los diferentes cultivos con 1500 células/pocillo. Expresada en media±SD. (*p<0,05).



Gráfico 2. Evolución de los diferentes cultivos a densidad 1500 células/pocillo a lo largo del tiempo.

| | 3 días | 7 días | 14 días | 21 días | 28 días |
|--------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------------------------|
| Control | 0,35±0,03 | 0,89±0,02 | 0,93±0,01 | 1,92±0,03 | 1,94±0,11 |
| 0,01 μΜ | 0,37±0,02 | 0,92±0,01 | 0,95±0,02 | 1,98±0,04 | 2,10±0,12 |
| 50 μM | 0,44±0,01 | 0,87±0,01 | 1,05±0,01 | 1,77±0,05 | 1,88±0,03 |
| 100 µM | 0,44±0,01 | 0,69±0,03 | 0,93±0,02 | 2,15±0,14 | <mark>2,29±0,26*</mark> |
| 150 μΜ | 0,44±0,02 | 0,66±0,02 | 0,83±0,03 | 1,96±0,03 | 1,97±0,31 |
| Dexametasona | 0,36±0,03 | 0,90±0,01 | 1,05±0,04 | 1,93±0,02 | 1,96±0,16 |

Tabla 6. Absorbancia en los diferentes cultivos con 2000 células/pocillo. Expresada en media±SD. (*p<0,05).



Gráfico 3. Evolución de los diferentes cultivos a densidad 2000 células/pocillo a lo largo del tiempo.

En todos los grupos y en todas las siembras (1000, 1500 y 2000 células/pocillo) se observa que entre los 21 y 28 días no existen cambios significativos en los valores de absorbancia debido a que cuando los cultivos alcanzan la confluencia el crecimiento celular se detiene por inhibición por contacto.

5. 4. Observaciones con microscopía óptica de contraste de fases

<u>Control 3 días</u>: a los 3 días, los cultivos control crecían lentamente y las células se encontraban unas separadas de las otras (Figura 30).



Figura 30. Cultivo control a los 3 días (20X).

<u>Control 7 días</u>: las células fueron formando colonias constituidas por 25-40 células, por término medio, manteniendo, en general, su morfología alargada y poligonal, observándose actividad mitótica en el cultivo (Figura 31).



Figura 31. Colonias o agregados celulares compuestos por 25-40 células de media (10X).

<u>Control 14 días</u>: las células fueron creciendo de manera que cada vez las colonias estaban más cerca unas de otras (Figura 32).



Figura 32. Cultivo control a los 14 días (10X).

<u>Control 21 días</u>: las células crecieron agrupándose contactando unas con otras, con crecimiento de tipo fibroblástico, y orientándose formando una monocapa que tapizaba la superficie de cultivo (Figura 33).



Figura 33. A los 21 días, las células formaron una imagen como de tapiz (10X).

<u>Cultivo con melatonina 0.01 μ M 3 días</u>: las células presentaban el mismo aspecto que el resto de cultivos en melatonina, independientemente de la concentración empleada (Figura 34).



Figura 34. Cultivo con melatonina 0.01 μ M a los 3 días (20X).

Cultivo con melatonina 0.01 µM 7 días: (Figura 35)



Figura 35. Cultivo con melatonina 0.01 μ M a los 7 días (10X).



Cultivo con melatonina 0.01 µM 14 días: (Figura 36)

Figura 36. Cultivo con melatonina 0.01 μM a los 14 días (10X).

<u>Cultivo con melatonina 0.01 µM 21 días:</u> a los 21 días, el cultivo celular alcanzó la confluencia, presentando una imagen de tapiz, sin espacios intercelulares (Figura 37).



Figura 37. Cultivo con melatonina 0.01 μ M a los 21 días (10X).

<u>Cultivos con melatonina 50 μ M a los 3 días:</u> cuando las células en cultivo fueron sometidas a la acción de melatonina 50 y 100 μ M su comportamiento y morfología varió en relación con los controles (Figura 38).



Figura 38. Cultivo con melatonina 50 μM a los 3 días (10X).

<u>Cultivos con melatonina 50 μ M a los 7 días:</u> Los hallazgos más notables se observaron a los 7 días de tratamiento (Figura 39) en los que los cultivos proliferaron (más colonias en menos tiempo) más rápido que con los demás tratamientos y respecto al control.



Figura 39. Cultivo con melatonina 50 μ M a los 7 días (10X).

<u>Cultivos con melatonina 50 μ M a los 14 días:</u> los cultivos eran confluentes en tan sólo 14 días (Figura 40).



Figura 40. Cultivo con melatonina 50 μ M a los 14 días (10X).

<u>Cultivos con melatonina 50 μ M a los 21 días:</u> se observa una morfología diferente a la de los cultivos control (Figura 41).



Figura 41. Cultivo con melatonina 50 μM a los 21 días (20X).

<u>Cultivos con melatonina 100 μ M a los 3 días:</u> las células se encuentran ampliamente separadas unas de otras (Figura 42).



Figura 42. Cultivo con melatonina 100 μ M a los 3 días (20X).

<u>Cultivos con melatonina 100 μ M a los 7 días</u>: con el paso de los días, fue creciendo el número de células, reduciendo los grandes espacios que se observaban a los 3 días (Figura 43).



Figura 43. Cultivo con melatonina 100 μ M a los 7 días (10X).

<u>Cultivos con melatonina 100 μ M a los 14 días:</u> las células mostraron un aspecto diferente a los controles (Figura 44).



Figura 44. Cultivo con melatonina 100 μM a los 14 días (10X).

<u>Cultivos con melatonina 100 μ M a los 21 días:</u> (Figura 45). En este momento, se observaron depósitos de material birrefringente que fue analizado, posteriormente, con el análisis espectroscópico, confirmando la presencia de material cálcico en el cultivo con melatonina 100 μ M (Figura 46).



Figura 45. Cultivo con melatonina 100 μM a los 21 días (10X).



Figura 46. Nódulo refringente en el cultivo con melatonina 100 μM a los 21 días.

<u>Cultivos con melatonina 150 μ M a los 3 días</u>: los cultivos en melatonina 150 μ M crecieron al mismo ritmo que los controles pero morfológicamente, presentaron el mismo patrón que el resto de cultivos tratados con melatonina (Figura 47).



Figura 47. Cultivo con melatonina 150 μM a los 3 días (20X).

<u>Cultivos con melatonina 150 μ M a los 7 días:</u> a los 7 días, los cultivos con melatonina 150 μ M presentaban un aspecto similar al resto de cultivos con diferentes concentraciones de melatonina a este mismo tiempo (Figura 48).



Figura 48. Cultivo con melatonina 150 μ M a los 7 días (20X).

Cultivos con melatonina 150 µM a los 14 días: (Figura 49)



Figura 49. Cultivo con melatonina 150 μM a los 21 días (10X).



Cultivos con melatonina 150 µM a los 21 días: (Figura 50)

Figura 50. Cultivo con melatonina 150 μ M a los 21 días (10X).

<u>Cultivos con dexametasona a los 3 días</u>: los cultivos en dexametasona siguieron un crecimiento normal-rápido, proliferando más rápidamente que los controles. La morfología fue similar a la encontrada en los cultivos en melatonina 50 y 100 μ M, apareciendo cambios morfológicos a partir de los 14 días (Figura 51).



Figura 51. Cultivo con dexametasona a los 3 días (20X).



Cultivos con dexametasona a los 7 días: (Figura 52)

Figura 52. Cultivo con dexametasona a los 7 días (20X).

Cultivos con dexametasona a los 14 días: (Figura 53)



Figura 53. Cultivo con dexametasona a los 14 días (10X).



Cultivos con dexametasona a los 21 días: (Figura 54)

Figura 54. Cultivo con dexametasona a los 21 días (10X).

Al igual que ocurrió con el cultivo en melatonina 100 μ M, en el cultivo en dexametasona se pudo observar depósitos de material birrefringente (Figura 55).



Figura 55. Nódulo refringente en el cultivo tratado con dexametasona a los 21 días (10X).

A los 21 días todos los cultivos con melatonina, independientemente de la concentración empleada, alcanzaron la confluencia (máxima capacidad de cubrimiento de superficie) sin diferencias morfológicas significativas. El aspecto morfológico de las CMM-*ah* prácticamente no varió con los tratamientos, tan sólo se pudo observar pequeños depósitos de material refringente (Figura 55) en los cultivos con dexametasona y melatonina 100 μ M. Estos depósitos fueron analizados, posteriormente, mediante el microanálisis espectroscópico.

5. 5. Estudio ultraestructural mediante microscopía electrónica de barrido

<u>A los 3 días</u>, las CMM-*ah* cultivadas en ausencia de melatonina (grupo control), mostraron un aspecto alargado y se encontraban unas separadas de las otras, creciendo lentamente, al igual que se observó con microscopia de contraste de fases (Figura 56).



Figura 56. CMM-*ah* alargadas y separadas unas de las otras.

<u>A los 7 días</u>, las CMM-*ah* mostraban un aspecto aplanado y alargado con algunas prolongaciones citoplasmáticas (Figura 57).



Figura 57. CMM-ah del cultivo control a los 7 días.

<u>A los 14 días</u> (Figura 58), adoptaban una morfología fusiforme y poligonal con extensas prolongaciones citoplasmáticas (filopodia).



Figura 58. CMM-*ah* fusiformes y con filopodios a los 14 días en cultivo control.

<u>A los 21 días</u>, la proliferación celular formaba un tapiz continuo siendo difícil reconocer las células de forma individual (Figura 59)



Figura 59. Imagen donde se observa un cultivo confluente.

<u>A los 3 días</u>, las CMM-*ah* expuestas a concentraciones de melatonina presentaban el mismo aspecto que los controles, observándose células de forma aislada o constituyendo grupos pequeños y dispersos (Figura 60).



Figura 60. CMM-*ah* en cultivo con melatonina a los 3 días.

<u>A los 7 días</u>, las células mostraban características morfológicas similares a las descritas anteriormente en el grupo control, exhibiendo una forma aplanada y prolongaciones citoplasmáticas desplegadas sobre la superficie del plástico (Figura 61).



Figura 61. CMM-*ah* en cultivo con melatonina a los 7 días.

<u>A los 14 días</u>, a diferencia del control, el número de células y, por tanto, el grado de confluencia fue mayor, no observándose variaciones morfológicas entre los grupos sometidos a la acción de las diferentes dosis de melatonina (Figura 62).



Figura 62. CMM-*ah* en cultivo con melatonina a los 14 días.

<u>A los 21 días</u>, cuando se alcanzó la confluencia, las CMM-*ah* cambiaron su morfología haciéndose más aplanadas y fusiformes con tendencia a orientarse en una misma dirección (Figura 63).



Figura 63. CMM-*ah* a los 21 días de cultivo con melatonina.

En este periodo destacamos la formación de nódulos de mineralización aislados en los cultivos tratados con melatonina 100 μ M y dexametasona (Figura 64).



Figura 64. Nódulo birrefringente encontrado en cultivo con dexametasona a los 21 días.

Con este método de estudio, al igual que el realizado con microscopia de contraste de fases, no se observaron diferencias morfológicas ni ultraestructurales entre las CMM-*ah* en relación a la concentración de melatonina empleada.

5. 6. Microanálisis espectroscópico

Los nódulos birrefringentes mostraron el espectro que se muestra en la Figura 65 y en el que destaca un pico que corresponde al elemento fósforo (P) y otro de menor intensidad correspondiente al calcio (Ca), mientras que los picos adyacentes, corresponden a artefactos del espectro provocado por diversos elementos Este espectro probó que se trataba de un material cálcico similar al que muestra la fracción mineral del tejido óseo.



Figura 65. Nódulo birrefringente y su espectro de composición elemental.

5. 7. Citometría de flujo

Se evaluó la expresión de los marcadores de membrana CD105, CD73 y CD90 porque la pérdida de expresión de los mismos se interpreta como un paso en el proceso de diferenciación de las CMM-*ah* a osteoblastos, ya que éstos carecen de esos marcadores de membrana.

El grupo control mantuvo constantes los valores de expresión de los tres marcadores a lo largo del tiempo.

La melatonina, a concentración fisiológica (0.01 μ M), produjo un descenso significativo (p<0.05) en la expresión de CD105 (p=0.001), CD73 (p=0.0005) y CD90 (p=0.0005) a los 7, 14 y 21 días de tratamiento continuo en comparación con las células tratadas a los 3 días. Este descenso en la expresión fue mayor a los 15 días para el CD105 y CD73, y a los 21 para el CD90. No se observaron diferencias significativas entre las células tratadas a los 7, 14 y 21 días de tratamiento.

El tratamiento con melatonina 50 μ M produjo una reducción estadísticamente significativa (p<0.05) de la expresión de CD105 (p=0.001), CD73 (p=0.001) y CD90 (p=0.002) a los 7, 14 y 21 días de continuo tratamiento en comparación con a los 3 días. Este descenso en la expresión fue mayor a los 7 días en todos los marcadores. No se observaron diferencias significativas entre los 7 y los 14-21 días de tratamiento.

El tratamiento con melatonina 100 μ M mostró diferencias estadísticamente significativas (p <0.05) en la expresión del marcador CD105 (p=0.002 test de Welch, p=0.019 test de Brown-Forsythe), CD73 (p=0.009 test de Welch, p=0.009 test de Brown-Forsythe), y CD90 (p=0.002) a los 7, 14 y 21 días de tratamiento en comparación con a los 3 días, como ocurrió con las concentraciones de 0.01 y 50 μ M. Sin embargo, este descenso en la expresión fue mayor a los 14 días para los marcadores CD105 y CD73, y a los 21 días para CD90. Aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los 7, 14 y 21 días de tratamiento para CD73 y CD90, si hubo para el marcador CD105 entre los 7 y los 14 días.

El tratamiento con melatonina 150 μM produjo niveles de expresión muy similares a los obtenidos para la concentración de melatonina 50 μM.

Finalmente, el tratamiento de las CMM-*ah* con dexametasona no produjo modificaciones (p <0.05) en la expresión de los marcadores CD105 y CD73 a los 7 y 14 días de tratamiento con respecto a los 3 días de tratamiento. Sin embargo, para el marcador CD90 si hubo diferencias estadísticamente significativas (p>0.05) a los 7, 14 y 21 días de tratamiento en comparación con a los 3. Además, a los 21 días de tratamiento hubo un gran descenso en la expresión del mismo, siendo estadísticamente significativo (p <0.05) en comparación con el CD105 y CD73. (Gráficos 4-6). El marcador CD73, también disminuyó el descenso en la expresión a los 21 días, en comparación con el resto de tiempos, siendo este descenso significativo (p<0.05). (Gráficos 4-6).



CD105 expression

Gráfico 4. Evolución de la expresión del marcador CD105 en los diferentes grupos de estudio y a lo largo del tiempo. Los datos son expresados como la media±SD.



Gráfico 5. Evolución de la expresión del marcador CD73 en los diferentes grupos de estudio y a lo largo del tiempo. Los datos son expresados como la media±SD.



CD90 expression

Gráfico 6. Evolución de la expresión del marcador CD90 en los diferentes grupos de estudio y a lo largo del tiempo. Los datos son expresados como la media±SD.
Los resultados indican un mejor comportamiento de la concentración de melatonina 50 µM cuando se analizan los tres marcadores en conjunto.

5.8. Determinación de la producción de fosfatasa alcalina

Se realizó la prueba de la determinación de la producción de la fosfatasa alcalina porque la presencia de esta enzima se interpreta como un paso hacia la diferenciación de las CMM-ah a osteoblastos. A los 14 días, no existen diferencias significativas entre los diferentes grupos. A los 21 días, la concentración de melatonina 50 µM consigue los valores más altos de expresión de fosfatasa alcalina cuando es comparado con cualquiera de los otros grupos de estudio. Además, esta diferencia es estadísticamente significativa cuando es comparado con el grupo de dexametasona (-2,023*) y con el grupo de melatonina 0.01 μM (-1.782**). También existe diferencia estadísticamente significativa cuando el grupo control es comparado con el grupo tratado con dexametasona, siendo el valor obtenido en el grupo de la dexametasona inferior al valor obtenido por el grupo control (-2.023*). A los 28 días, al igual que ocurrió a los 21 días, el grupo de melatonina 50 µM es el que muestra mejores resultados al ser comparado con el resto de grupos, además, las diferencias son significativas cuando se compara con el grupo tratado con melatonina 0.01 μM (-2.203**) y con el grupo de la dexametasona (-2.001*). Al comparar el grupo de melatonina 150 µM con el grupo de la dexametasona, también se obtienen resultados significativos (-1.782**) al igual que la comparación entre el grupo de melatonina 0.01 μ M y el de la dexametasona (-1.782**). En base a los resultados, el grupo cultivado en MO (dexametasona 100 μM) obtuvo valores menores de producción de fosfatasa alcalina en comparación con el resto de grupos, especialmente a los 28 días, porque aunque las diferencias no sean significativas cuando es comparado con los grupos de melatonina 100 μ M y el control, en todos los casos presenta valores inferiores de producción. El grupo cultivado con melatonina 50 µM mostró mayor producción de fosfatasa alcalina por lo que parece que puede estimular a las células madre a diferenciarse a osteoblastos (Tabla 67).

| Tabla 7. Test de Wilcoxon en la prueba de la producción de fosfatasa alcalina. | dexa – mela 0.01 | I | I | -1,214 | (0,225) | - <mark>1,782**</mark> | <mark>(0,075)</mark> | |
|--|---------------------------------|---------|---------|------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|------------------------------|
| | Mela 0.01 – mela 150 | -1,604 | (0,109) | -0,535 | (0,593) | -0,674 | (0,500) | |
| | dexa – mela 150 | I | I | -1,604 | (0,109) | -1,782** | (0,075) | |
| | dexa – control | I | I | <mark>-2,023*</mark> | <mark>(0,043)</mark> | -0,135 | (0,893) | |
| | Mela 0.01 – control | -1,342 | (0,180) | -1,159 | (0,249) | -0,674 | (0,500) | |
| | Mela 150 - control | 0,000 | (1,000) | -1,069 | (0,285) | -0,674 | (0,500) | <mark>netasona</mark> . |
| | Mela 0.01 – mela 100 | -0,447 | (0,655) | 0,000 | (1,000) | -1,214 | (0,225) | <mark>Dexa: dexan</mark> |
| | dexa – mela 100 | -1,069 | (0,285) | -1,604 | (0,109) | -1,424 | (0,120) | <mark>nelatonina;</mark> |
| | Mela 150 - Mela 100 | -0.674 | (0,500) | -0,943 | (0,345) | -1,214 | (0,225) | <mark>l0%; Mela: r</mark> |
| | control -Mela 100 | -1,342 | (0,180) | -1,095) | (0,273) | -0,944 | (0,345) | lificación al 1 |
| | dexa – mela 50 | I | I | - <mark>2,023*</mark> | <mark>(0,043)</mark> | -2,001* | <mark>(0,028)</mark> | <mark>5%. (**) Sign</mark> |
| | Mela 0.01 – mela 50 | -0,447 | (0,655) | - <mark>1,782**</mark> | <mark>(0,075)</mark> | <mark>-2,203**</mark> | <mark>(0,075)</mark> | lificación al <mark>5</mark> |
| | Mela 150 <i>–</i> mela 50 | 000′0 | (1,000) | -1,604 | (0,109) | -1,572 | (0,116) | <mark>esis. (*) Sigr</mark> |
| | Mela 100 – mela 50 | -0,730 | (0,465) | 0,000 | (1,000) | -1,363 | (0,173) | <mark>entre parént</mark> |
| | Control – Mela 50 | -0,447 | (0,655) | -0,943 | (0,345) | -1,214 | (0,225) | <mark>gnificativos e</mark> |
| | | 15 días | | 21 días | | 28 días | | <mark>Valores si</mark> t |

El siguiente gráfico (Gráfico 7) ilustra la tabla del test de Wilcoxon, para apreciar los resultados con mayor claridad:



Gráfico 7. Valores obtenidos en el test de Wilcoxon en la prueba de la producción de fosfatasa alcalina.

5. 9. Determinación de osteogénesis

Realizamos la tinción rojo alizarina para comprobar si se produjo formación de depósitos de calcio en los cultivos con melatonina (0.01 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M) y con dexametasona (100 μ M) a los 21 y 28 días de cultivo. Como control negativo utilizamos el cultivo de CMM-*ah* en MC donde no se produjo formación de depósitos de calcio (Figura 66).



Figura 66. Cultivo control rojo alizarina negativo.

<u>A los 21 días</u>, todos los cultivos con melatonina (independientemente de la concentración) y con dexametasona, fueron rojo alizarina positivos, aunque unas dosis mostraron mayor intensidad que otras. Entre las concentraciones de 0.01 μ M y 50 μ M no existen diferencias en el grado de intensidad, siendo éste un poco menor que con el resto de concentraciones de melatonina (Figuras 67 y 68).



Figura 67. Cultivo con melatonina 0.01 µM a los 21 días (10X).



Figura 68. Cultivo con melatonina 50 µM a los 21 días (10X).

Las diferencias más significativas en la intensidad de la tinción las encontramos en los cultivos con melatonina 100 μ M y 150 μ M y en dexametasona. En las imágenes se observa que la tinción es también absorbida por las células, a diferencia de los cultivos con melatonina 0.01 μ M y 50 μ M donde la tinción era más difusa (Figuras 69, 70 y 71).



Figura 69. CMM-*ah* expuestas a melatonina 100 μM durante 21 días. Se observa Gran intensidad de tinción, con numerosos puntos negros (10X).



Figura 70. Gran intensidad de tinción que se produjo en el cultivo con melatonina 150 µM a los 21 días (10X).



Figura 71. Vista más detallada (20X) de un cultivo con dexametasona a los 21 días.

<u>A los 28 días</u>, los cultivos con melatonina 50 μ M, 100 μ M y 150 μ M y dexametasona alcanzaron, aproximadamente, el mismo grado de intensidad de la tinción. Únicamente el cultivo con melatonina 0.01 μ M, a pesar de ser rojo alizarina

positivo, mantuvo la misma intensidad que a los 21 días, siendo ésta ligeramente menor que en el resto de concentraciones. (Figuras 72, 73, 74, 75 y 76).



Figura 72. Tinción obtenida en el cultivo con melatonina 0.01 μ M tras 28 días de cultivo (10X).



Figura 73. Cultivo con melatonina 50 μ M (20X).



Figura 74. Cultivo con melatonina 100 μM tras 28 días de incubación (10X).



Figura 75. Cultivo con melatonina 150 μ M. Se aprecia gran intensidad de la tinción rojo alizarina (20X).



Figura 76. Cultivo con dexametasona tras 28 días de incubación (10X).

En base a que todos los cultivos con melatonina (0.01 μ M, 50 μ M, 100 μ M y 150 μ M) y dexametasona (100 μ M) fueron positivos a la tinción con rojo alizarina tanto a los 21 como a los 28 días, podemos concluir que en todos ellos se produjo formación de depósitos de calcio aunque en los cultivos con melatonina 50 μ M, 100 μ M y 150 μ M y dexametasona la intensidad fue mayor, por lo que se entiende que hubo mayor formación de depósitos de calcio que en el cultivo con melatonina a concentración 0.01 μ M.

5. 10. PCR clásica y PCR cuantitativa

Antes de realizar las PCR cuantitativas se realizaron PCR clásicas para verificar el éxito de la extracción del ARN y la copia del mismo a ADNc. En todas las muestras se detectó el gen de la β-actina (Figura 77).



Figura 77. Producto de la PCR que muestra la presencia del gen de la β-actina en las muestras de estudio.

Una vez realizadas las PCR clásicas, se realizaron las PCR cuantitativas para evaluar la expresión de los genes del colágeno tipo I, de la osteocalcina y del OCT-4.

Los resultados de la expresión del gen del colágeno tipo I vienen representados en el siguiente gráfico (Gráfico 8):



Gráfico 8. Expresión del gen del colágeno tipo I según el tratamiento y a lo largo del tiempo.

A los 3 días muestran que no existen diferencias significativas (p>0.05) entre grupos. A los 7 días, la concentración de melatonina 0.01 μ M es la que obtiene valores más altos de expresión del gen pero el resto de concentraciones (50 μ M, 100 μ M, 150 μ M y dexametasona) consiguen niveles de expresión inferiores al control. A los 14 días, los resultados para las concentraciones de melatonina fueron significativamente mayores (p<0.05), especialmente para la concentración de melatonina 100 μ M. A partir de este momento, se puede observar una disminución de la expresión en todos los grupos tratados con melatonina, a excepción del grupo de la dexametasona, que consigue valores significativamente más elevados (p<0.05).

En relación al gen de la osteocalcina, se observó lo siguiente (Gráfico 9):



OSTEOCALCINA

Gráfico 9. Expresión del gen de la osteocalcina según el tratamiento y a lo largo del tiempo.

A los 3 días no existen diferencias significativas (p>0.05) de expresión entre grupos. A los 7 días de incubación, existe un incremento estadísticamente significativo (p<0.05)

en la expresión del gen en concentraciones de melatonina 0.01 μ M, 50 μ M y 100 μ M. A los 14 días, los valores comienzan a disminuir en todos los grupos. Al igual que ocurrió con el gen del colágeno, el grupo tratado con dexametasona a los 21 días consiguió resultados estadísticamente mejores que a los 14 días. La concentración de melatonina 150 μ M muestra bajos niveles de expresión a todos los tiempos.

Por último, los resultados de la expresión del gen del OCT-4 a los 3 días muestran que no existen diferencias significativas (p>0.05) entre grupos. A los 7 días, los niveles más bajos se obtienen con la concentración de melatonina 150 μ M mientras que a los 14 días, los valores más bajos se consiguen con las concentraciones de melatonina 150 μ M y 50 μ M. A los 21 días de tratamiento, son las concentraciones de melatonina 100 μ M y 50 μ M las que muestran los valores de expresión más bajos. El grupo tratado con dexametasona, a los 14 días, obtiene bajos niveles de expresión aunque a los 21 días, se observa un gran incremento en la expresión de dicho gen. (Gráfico 10).



Gráfico 10. Expresión del gen del OCT4 según el tratamiento y a lo largo del tiempo.

A la vista de los resultados y relacionando los niveles de expresión de los tres genes, es la concentración de 50 μ M la que mejor se comporta ya que a los 14 días muestra altos niveles de expresión de los genes del colágeno tipo I y de la osteocalcina y, a ese mismo tiempo, es la que obtiene los valores más bajos de expresión del gen OCT-4. En base a la interpretación de los datos obtenidos, la concentración de melatonina 50 μ M ayuda a las CMM-*ah* en su proceso de diferenciación a osteoblastos ya que aumenta la expresión de los genes de colágeno tipo I y de la osteocalcina y disminuye la del gen OCT-4 (marcador de células indiferenciadas). La concentración de melatonina 100 μ M se comporta de manera similar a la de 50 μ M. Por el contrario, la exposición prolongada a la dosis de 150 μ M no tuvo efecto sobre la expresión génica de un modo significativo.

6. DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

La melatonina está implicada en el desarrollo del hueso a través de la inhibición de la diferenciación osteoclástica, mediada por diferentes mecanismos, incluyendo la vía de neutralización de radicales libres generados por los osteclastos^{68,101} y, a través de su efecto protector, estimulando la osteogénesis ósea por medio de la diferenciación osteoblástica^{102,103}.

La melatonina, además de estar implicada en el desarrollo óseo, afecta a muchos otros procesos. Así pues, influye en la proliferación celular, inhibiéndola o facilitándola, dependiendo del tipo de células estudiadas y de la concentración de melatonina usada. Concretamente, la melatonina inhibe la proliferación de células cancerosas o tumorales, tales como células de cáncer de próstata y ovario, células de melanoma, células de adenocarcinoma de colon así como células de cáncer de mama⁷⁸.

Sin embargo, se ha demostrado que la melatonina estimula o incrementa la proliferación celular en osteoblastos humanos, células óseas y en preadipocitos 3T3L1. **Nakade y cols.**² observaron un incremento estadísticamente significativo en la proliferación tanto en células óseas humanas normales aisladas del hueso de la mandíbula por digestión de colagenasa (células HOB-M) como en una línea celular osteoblástica humana (células SU-HFO), siendo la máxima proliferación a una concentración de 50 μ M de melatonina, después de 24 horas de incubación con

¹⁰¹ Juknat AA, Mendez MDELV, Quaglino A, Fameli CI, Mena M, Kotler ML. Melatonin prevents hydrogen peroxide-induced Bax expression in cultured rat astrocytes. J Pineal Res 2005;38:84-92.

¹⁰² Suzuki N, Somei M, Seki A, Reiter RJ, Hattori A. Novel bromomelatonin derivatives as potentially effective drugs to treat bone diseases. J Pineal Res 2008;45:229-234.

¹⁰³ Radio NM, Doctor JS, Witt-Enderby PA. Melatonin enhances alkaline phosphatase activity in differentiating human adult mesenchymal stem cells grown in osteogenic medium via MT2 melatonin receptors and the MEK/ERK (1/2) signaling cascade. J Pineal Res 2006;40:332-342.

melatonina en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium). **Satomura y cols.**¹⁰⁴ en 2007 también observaron que la proliferación de células osteoblásticas humanas procedentes de la mandíbula aumentaba de forma dosis-dependiente cuando se exponen a melatonina (50 μ M, 100 μ M, 200 μ M) durante 5 días.

En los pocos estudios realizados con CMM-ah se ha observado inhibición o no efecto aparente sobre la proliferación celular cuando se administra melatonina a las células. Radio y cols.¹⁰³ en 2006 observaron una inhibición estadísticamente significativa en la proliferación celular en los grupos de tratamiento que contenían melatonina (50 nM), medio osteogénico o ambos. Los efectos inhibitorios observados en el grupo de la melatonina sin medio osteogénico se atribuyeron a la acción inhibitoria de la melatonina sobre este tipo de células, como también se ha observado en células cancerosas previamente. La inhibición de la proliferación en el grupo con medio osteogénico y sin melatonina podría deberse a los efectos inhibitorios de la dexametasona sobre la proliferación de las CMM-ah. Sorprendentemente, la melatonina en combinación con el medio osteogénico no inhibía aún más la proliferación en comparación con el grupo con medio osteogénico y sin melatonina. Tal vez, ese nivel de inhibición fue máximo y no podría ocurrir una mayor disminución en la proliferación. En el estudio de **Zhang y cols.**¹⁰⁵ en 2010 los datos demuestran que la melatonina, tanto a concentraciones fisiológicas (0.01 µM, 1 nM) como farmacológicas (100 μM) no estimula la proliferación celular. Postularon que el efecto de la melatonina sobre la división celular puede depender del tipo específico de

¹⁰⁴ Satomura K, Tobiume S, Tokuyama R, Yamasaki Y, Kudoh K, Maeda E, Nagayama M. Melatonin at pharmacological doses enhances human osteoblastic differentiation in vitro and promotes mouse cortical bone formation in vivo. J Pineal Res 2007;42:231-239.

¹⁰⁵ Zhang L, Su P, Xu C, Chen C, Liang A, Du K, Peng Y, Huang D. Melatonin inhibits adipogenesis and enhances osteogenesis of human mesenchymal stem cells by suppressing PPARy expression and enhancing Runx2 expression. J Pineal Res 2010;49:364-372.

células. Al igual que en el estudio de **Sethi y cols.**¹⁰⁶, las CMM-*ah* que fueron expuestas a melatonina (50 nM) durante 2, 10 y 21 días en presencia de MO no mostraron diferencia significativa en la proliferación con respecto a los controles. De otro lado, los resultados derivados de nuestro estudio demuestran lo contrario. La melatonina a concentraciones de 0.01 μ M, 50 μ M, 100 μ M y 150 μ M promovió la proliferación celular a los 28 días, consiguiendo mayores niveles de proliferación que el grupo tratado con dexametasona 100 μ M. Este patrón de crecimiento se produjo en todas las siembras (1000, 1500 y 2000 células/pocillo). A pesar de que las diferencias en la proliferación no fueron elevadas (a excepción del grupo tratado con melatonina 100 μ M), se puede concluir que la melatonina no reduce la capacidad de proliferación de las CMM-*ah*.

El hueso de los mamíferos se remodela continuamente a través de la reabsorción del hueso viejo por las células de resorción, los osteoclastos, y de la subsiguiente formación de hueso nuevo por células de formación, los osteoblastos. Estos dos acontecimientos, estrechamente asociados, son los responsables de la renovación del esqueleto, manteniendo su integridad anatómica y estructural¹⁰⁷. En este proceso de remodelación ósea, que tiene un patrón de 24 horas, con la resorción ósea y, en menor medida, la formación ósea que aumenta por la noche, los osteoclastos utilizan una variedad de agentes químicos para la degradación ósea. Un componente importante de este proceso es la generación de radicales libres, se producen altos niveles de aniones superóxido durante la resorción ósea que contribuyen al proceso de

¹⁰⁶ Sethi S, Radio NM, Kotlarczyk MP, Chen CT, Wei YH, Jockers R, Witt-Enderby PA. Determination of the minimal melatonin exposure required to induce osteoblast differentiation from human mesenchymal stem cells and these effects on downstream signaling pathways. J Pineal Res 2010;49:222-238.

¹⁰⁷ Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. Endocrine Rev 2000;21:115-137.

degradación. Uno de los mecanismos para su eliminación es a través de la enzima superóxido dismutasa¹⁰⁸.

La melatonina es un importante captador de radicales libres y antioxidante, tanto a concentraciones fisiológicas como farmacológicas. Además de su capacidad para neutralizar directamente una serie de radicales libres, el oxígeno reactivo y especies de nitrógeno, la melatonina estimula varias enzimas antioxidantes que aumentan su eficacia como antioxidante. La melatonina es capaz de proteger macromoléculas en todos los compartimientos de la célula del daño oxidativo y especialmente en las membranas celulares debido a su alta solubilidad en lípidos, haciéndolos más resistentes al ataque oxidativo. Por lo tanto, la prevención de actividad de los osteoclastos en el hueso puede depender, en parte, de las propiedades de la melatonina para eliminar los radicales libres^{109,110}.

Los niveles de melatonina disminuyen con la edad⁸². Desde hace muchos años, se cree en la participación de la melatonina en los trastornos relacionados con la edad. La melatonina también disminuye durante la menopausia, y la disminución de los niveles plasmáticos de melatonina puede ser un importante factor que contribuya en el desarrollo de la osteoporosis postmenopáusica. La disminución de los niveles de melatonina puede ser un factor agravante de la pérdida de masa ósea en mujeres postmenopáusicas. El primer indicio de que la melatonina podía ser eficaz *in vivo* para disminuir la pérdida ósea fue en ratas ovariectomizadas¹¹¹. La desoxipiridinolina

¹⁰⁸ Collin-Osdoby P, Li L, Rothe L, Anderson F, Kirsch D, Oursler MJ, Osdoby P. Inhibition of avian osteoclast bone resorption by monoclonal antibody 121F: a mechanism involving the osteoclast free radical system. J Bone Miner Res 1998;13:67-78.

¹⁰⁹ Reiter RJ, Tan DX, Allegra M. Review. Melatonin: Reducing molecular pathology and dysfunction due to free radicals and associated reactants. Neuro endocrinol Lett 2002;23:3-8.

¹¹⁰ Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter RJ, Miyahara Y. Melatonin reduces oxidative damage of neural lipids and proteins in senescenceaccelerated mouse. Neurobiol Aging 2002;23:639-644.

¹¹¹ Ladizesky MG, Cutrera RA, Boggio V, Somoza J, Centrella JM, Mautalen C, Cardinali DP. Effect of melatonin on bone metabolism in ovariectomized rats. Life Sci 2001;70:557-565.

urinaria (un marcador de la resorción ósea) y la excreción de calcio, los niveles circulantes de calcio y fósforo, la actividad de la fosfatasa alcalina, la densidad mineral ósea y el área ósea, se midieron en ratas adultas hasta 60 días después de la ovariectomía. Las ratas recibieron melatonina (25 μ g/mL de agua) o agua sola. La desoxipiridinolina urinaria aumentó significativamente después de la ovariectomía en un 51% (30 días después de la cirugía) y un 47% (60 días después de la cirugía). El aumento de la desoxipiridinolina encontrado 30 días después de la ovariectomía no fue observado en las ratas tratadas con melatonina. 15 días después de la cirugía, un aumento significativo del fósforo sérico y en los niveles de fosfatasa alcalina se produjo en las ratas ovariectomizadas que recibieron melatonina en comparación con sus controles. 60 días después de la cirugía, la densidad mineral ósea y el área ósea disminuyó significativamente en ratas ovariectomizadas, un efecto no modificado por la melatonina. Los resultados apoyan la conclusión de que a dosis farmacológicas de melatonina se modifica la remodelación ósea después de la ovariectomía. Las conclusiones derivadas del estudio de Ladizesky y cols.¹¹¹ en 2001 están en consonancia con los resultados que se han obtenido en el nuestro pues, en base al análisis de los datos, la melatonina ha demostrado ser un sustrato efectivo en la promoción del hueso.

La melatonina tiene la capacidad de promover directamente la maduración de los osteoblastos al igual que ocurre con otros hormonas, como por ejemplo la hormona del crecimiento¹¹². Esta capacidad de la melatonina de promover la maduración de los osteoblastos se demostró, por primera vez, en células clones preosteoblásticas originarias de la calota de ratones recién nacidos (células MC3T3) y en células de osteosarcoma osteoblástico de rata (células ROS), en las que determinadas concentraciones de melatonina incrementaron la expresión génica de proteínas marcadoras de hueso, como la BSP, ALP, osteopontina, colágeno tipo I y

¹¹² Haase HR, Ivanovski S, Waters MJ, Bartold PM. Growth hormone regulates osteogenic marker mRNA expression in human periodontal fibroblasts and alveolar bone-derived cells. J Periodontal Res 2003;38:366-374.

osteocalcina. Concretamente, en las células MC3T3, concentraciones de melatonina tan bajas como 10 nM (0.01 uM) fueron suficientes para estimular la transcripción del gen de la BSP en presencia de β -glicerofosfato y ácido ascórbico¹. La melatonina en medio de crecimiento tiene un efecto menor en la expresión del gen de osteopontina y colágeno al compararlos con los cultivos controles en medio osteogénico. El incremento en la expresión de los genes de BSP y ALP se produjo entre los días 5 y 9 después de la exposición continua a la hormona aunque la expresión de ALP se desarrolló antes del incremento de BSP. Como ocurre con ALP, la expresión de osteopontina es también un marcador temprano de diferenciación ósea, y el incremento es observado hacia el día 5 después del inicio del tratamiento con melatonina. Los cultivos control en ausencia de melatonina requirieron de mayores tiempos de incubación para la expresión de los genes de proteínas óseas. Las células ROS expresan proteínas óseas cuando se cultivan en presencia de ácido ascórbico y βglicerofosfato. Cuando estas células se cultivaron en presencia de melatonina 50 nM (0.05 uM) y ácido ascórbico y β-glicerofosfato, se produjo un rápido incremento en la expresión de los genes de BSP y osteocalcina.

En un estudio posterior con células osteoblásticas humanas¹⁰⁴, la melatonina también aumentó la expresión de ARNm para el colágeno tipo I, la osteopontina, la BSP y la osteocalcina. Además, la actividad de la ALP fue significativamente mayor en el tiempo después del día 6 de cultivo de las células con melatonina (10 uM o superior) comparado con el grupo control. La ALP es el marcador bioquímico más reconocido en la actividad osteoblástica¹¹³; por lo que la actividad de esta enzima es usada para medir diferenciación osteoblástica y su actividad aumenta conforme progresa la diferenciación celular³⁰. En este estudio, la actividad de esta enzima alcanzó un máximo en el día 12 del cultivo en el grupo tratado con melatonina (50 uM o superior) y disminuyó desde entonces hasta el día 15, mientras que en el grupo control siguió

¹¹³ Sabokbar A, Millett PJ, Myer B, Rushton N. A rapid, quantitative assay for measuring alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells in vitro. Bone Miner 1994;27:57-67.

aumentando hasta el día 15 de cultivo. Este estudio corrobora lo que anteriores estudios mostraban en relación al aumento de la actividad de la ALP con la maduración de los osteoblastos y su posterior disminución. Estos resultados sugieren que la melatonina estimula la diferenciación de osteoblastos humanos.

Resultados similares fueron reportados en las células óseas humanas normales aisladas de hueso de mandíbula (células HOB-M) y en una línea celular osteoblástica humana (células SU-HFO), en las que concentraciones micromolares de melatonina (50uM, 100 uM) aumentaron significativamente la producción de colágeno tipo I². Sin embargo, no aumentó la actividad de la ALP ni la secreción de osteocalcina.

Hasta ahora, hemos visto artículos que estudian el efecto de la melatonina sobre el tejido óseo. Pero estas investigaciones se han realizado o bien en células madre de animales o bien en osteoblastos o células preosteoblásticas. El problema de utilizar células madre de animales radica en que no podemos extrapolar los resultados fielmente al ser humano. Por eso, es de gran importancia, una vez realizados estudios preliminares en animales, continuar con estudios en humanos. Así pues, tan sólo Radio y cols.¹⁰³ en 2006, Sethi y cols.¹⁰⁶ en 2010 y Zang y cols.¹⁰⁵ en 2010 emplearon CMMah para el estudio del efecto de la melatonina en la diferenciación osteoblástica. Por otro lado, debemos resaltar que no podemos comparar los resultados derivados de la utilización de células preosteoblásticas u osteoblastos con los resultados obtenidos en los estudios que utilizan CMM-ah, ya que la diferencia radica en que en los primeros se estudia si la melatonina potencia o acelera los procesos propios de los osteoblastos, mientras que en los segundos, se estudia si la melatonina es capaz de inducir diferenciación de las CMM-ah osteoblastos (recordemos que las CMM-ah también se pueden diferenciar en condrocitos y adipocitos). De este modo, los resultados obtenidos en nuestro estudio pueden ser discutidos únicamente con los resultados mostrados por Radio y cols.¹⁰³, Sethi y cols.¹⁰⁶ y Zang y cols.¹⁰⁵. En el estudio de Radio **y cols.**¹⁰³ en 2006, no se produjo incremento inducido por la melatonina (50 nM=0.05 uM) en la actividad de ALP en las CMM-ah cultivadas en medio de crecimiento normal,

sin embargo, sí observaron un incremento inducido por la melatonina en la actividad de la ALP en las células cultivadas en medio osteogénico, que contiene ascorbato, dexametasona y β -glicerofosfato. Los resultados obtenidos en nuestro estudio son contrarios ya que el grupo cultivado con melatonina 50 µM produjo los mayores incrementos en la producción de ALP. El grupo cultivado con melatonina 100 µM también aumentó la producción de la misma. Este desacuerdo en los resultados puede ser interpretado como una diferencia en las concentraciones utilizadas en los dos estudios. Radio y cols.¹⁰³ emplean la melatonina a 50 nM, concentración inferior a la dosis fisiológica (0.01 μ M). Nosotros creemos que una concentración tan baja es insuficiente para producir efecto alguno en la diferenciación de las CMM-ah a osteoblastos. Zhang y cols.¹⁰⁵ en 2010 observaron que la actividad de la ALP de las células tratadas con melatonina y cultivadas en medio osteogénico aumentó significativamente de forma dosis-dependiente (0.01 μ M, 1 nM, 100 μ M). Las células tratadas con melatonina alcanzaron un pico en la actividad de la ALP al día 10 y, a partir de ese momento, disminuyó. En las células control (MO sin melatonina), la actividad de la fosfatasa alcalina continuó aumentando hasta el día 14. También hubo un incremento de la expresión de ARNm de RUNX2, osteopontina y osteocalcina comparado con el grupo control (MO sin melatonina). En relación al diseño de este estudio, podemos concluir que demuestran que la melatonina produce diferenciación osteoblástica pero la añaden al MO que, como se ha mencionado anteriormente, ha sido ampliamente demostrada su capacidad de inducir diferenciación de las CMM-ah a células de estirpe osteoblástica. En nuestro estudio, los resultados sugieren que la melatonina aumenta la producción de ALP de manera directa y por sí sola. Este diseño muestra claramente el efecto conseguido por la hormona, ya que si la añadimos al MO, los datos pueden llevarnos a error porque el aumento de la producción de ALP puede ser debido a la dexametasona contenida en el MO o a una acción sinérgica de esta con la melatonina. Nuestros resultados no mostraron una disminución de la producción de ALP con el tiempo, es más, fue a partir de los 21 días cuando obtuvimos resultados estadísticamente significativos en el grupo tratado con melatonina 50 μM.

es de importancia resaltar que el grupo tratado con dexametasona 100 µM mostró bajos niveles de producción de ALP, especialmente a los 28 días. En nuestro estudio concentraciones de melatonina de 50 μ M y 100 μ M, produce altos niveles de expresión de los genes del colágeno tipo I y de la osteocalcina a los 14 días, mientras que, a ese mismo tiempo, existen niveles ínfimos de expresión del gen OCT-4. Estos datos están en consonancia con los niveles de producción de ALP, ya que el grupo cultivado a concentraciones de 50 µM es donde se produjo mayor producción de fosfatasa alcalina, lo que sugiere que la melatonina 50 µM puede estimular a las células madre a diferenciarse a osteoblastos. En el estudio de Sethi y cols.¹⁰⁶ en 2010 se observó que bajo una exposición continuada de melatonina en MO durante 21 días las CMM-ah aumentaron su diferenciación a osteoblastos, medida por un incremento de la actividad de la ALP y de la mineralización, comparado con el control (MO). Se observó un incremento significativo de la actividad de la ALP cuando se añadió melatonina al medio durante 2 días hacia el final de los 21 días en cultivo con MO, comparado con las células que se cultivaron en MO sin melatonina durante 21 días. Sin embargo, no se produjo un efecto significativo en la actividad de la ALP en las células tratadas con melatonina durante 5, 10 o 14 días comparado con el control (MO). Estos resultados fueron similares a los descritos por **Roth y cols.**¹, que sugieren que las células MC3T3 (células preosteoblásticas) deben primero diferenciarse antes de ser receptivas a la melatonina. Como se ha comentado anteriormente, no podemos comparar los datos derivados del estudio de Sethi y cols.¹⁰⁶ con los nuestros puesto que las condiciones de cultivo de las células no fueron las mismas, al añadir la melatonina al MO.

La tinción rojo alizarina es usada, desde hace muchos años, como un método rápido y cómodo para visualizar la presencia de cristales de apatita y de calcio¹¹⁴. **Sheti y cols.**¹⁰⁶ observaron que CMM-*ah* en cultivo con concentraciones de melatonina 50

¹¹⁴ Paul H, Reginato AJ, Schumacher HR. Alizarin red S staining as a screening test to detect calcium compounds in synovial fluid. Arthritis Rheum 1983;26:191-200.

nM producían depósitos de calcio a partir de los 21 días. Por otro lado, **Satomura y cols.**¹⁰⁴, en su estudio con osteoblastos, observaron que las concentraciones de melatonina 100 μ M y 200 μ M estimularon significativamente la formación de matriz mineralizada a los 18 días.

Nuestros resultados confirman los resultados obtenidos en estos estudios ya que nosotros hemos obtenido producción de depósitos de calcio en los cultivos tratados con melatonina (0.01 μ M, 50 μ M, 100 μ M y 150 μ M) a los 21 días. A los 28 días de tratamiento, los cultivos en melatonina, a excepción del cultivo en melatonina 0.01 μ M, alcanzaron una gran intensidad de la tinción rojo alizarina, lo que confirma la capacidad de la melatonina para promover o ayudar a las CMM-*ah* a diferenciarse a células de estirpe osteoblástica. Además, realizamos el microanálisis espectroscópico de los nódulos birrefringentes observados en los cultivos con melatonina 100 μ M y dexametasona, probando que estaban compuestos por material cálcico similar a la fracción mineral del tejido óseo.

No hemos encontrado ningún estudio que a la hora de analizar la acción de la melatonina sobre las CMM-*ah* en la diferenciación osteoblástica, evalúe la pérdida de expresión de los marcadores de membrana. La evaluación mediante microscopía de flujo es de gran importancia ya que nos indica que, a medida que desciende la expresión de los marcadores de membrana CD105, CD90 y CD73, las células están comenzando su proceso de diferenciación. Los resultados que hemos obtenido, señalan a la melatonina 50 µM como la concentración que produce mayor pérdida de los marcadores de expresión a la de 50 µM. Nuestro estudio es el único que demuestra que la melatonina produce una disminución de la expresión de los marcadores CD105, CD90 y CD73, entendiéndose esta pérdida progresiva como un paso más en la diferenciación de las CMM-*ah* a osteoblastos.

119

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

Una vez establecidos los objetivos y habiendo analizado los resultados, las conclusiones derivadas de este estudio son las siguientes:

- 1. La melatonina se comporta como un material citocompatible y bioactivo capaz de inducir diferenciación de las CMM-*ah* a osteoblastos per se.
- 2. La densidad óptima de cultivo celular es de 1500 células por pocillo (de la placa de 96), consiguiendo ésta la mayor proliferación celular a los 28 días.
- La melatonina a concentración 50 μm ayuda a la diferenciación de CMM-ah a osteoblastos ya que produce:
 - a. Disminución de la expresión de marcadores de membrana CD105, CD90 y CD73.
 - b. Aumento de los niveles de producción de fosfatasa alcalina en comparación con el control y con el grupo tratado con dexametasona.
 - c. Producción de depósitos de calcio a los 28 días, comprobado con la tinción rojo alizarina.
 - d. Expresión de genes de naturaleza osteoblástica como el colágeno tipo
 I y la osteocalcina. A la vez que se produce una disminución de la expresión del gen OCT-4, propio de células indiferenciadas.
- 4. La melatonina es un sustrato efectivo en la promoción de la regeneración ósea, apropiado para su utilización en la bioingeniería tisular ósea.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

¹ Roth JA, Kim BG, Lin WL, Cho MI. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. J Biol Chem 1999;274:22041-22047.

² Nakade O, Koyama H, Ariji H, Yajimi A, Kaku T. Melation stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells *in vitro*. J Pineal Res 1999;27:106-110.

³ Koyama H, Nakade O, Takada Y, et al. Melatonin at pharmacologic doses increases bone mass by suppressing resorption through down-regulation of the RANKL-mediated osteoclast formation and activation. J Bone Miner Res 2002;17:1219-1229.

⁴ Ostrowska Z, Kos-Kudla B, Marek B, Kajdaniuk D, Ciesielska-Kopacz N. The relationship between the daily profile of chosen biochemical markers of bone metabolism and melatonin and other hormone secretion in rats under physiological conditions. Neuro Endocrinol Lett 2002;23:417-425.

⁵ Ostrowoska Z, Kos-Kudla B, Nowak M, Swietochowka E, Marek B, Gorski D, Kajdaniuk K. The relationship between bone metabolism, melatonin and other hormones in sham- operarated and pinealectomized rats. Endocr Regul 2003;37:211-224.

⁶ Ladizesky MG, Boggio V, Cutrera RA, Mondelo N, Mastaglia S, Somoza J, Cardinali DP. Melatonin effects on bone metabolism in rats treated with methylprednisolone. J Pineal Res 2006;40:297-304.

⁷ Cutando A, Gomez G, Arana C, Muñoz F, López-Peña M, Stephenson J, Reiter RJ. Melatonin stimulates osteointegration of dental implants. J Pineal Res 2008;45:174-179.

⁸ Takechi M, Tatehara S, Satomura K, Fujisawa K, Nagayama M. Effect of FGF-2 and melatonin on implant bone healing: a histomorphometric study. J Mater Sci Mater Med 2008;19:2949-2952.

⁹ Guardia J, Gómez-Moreno G, Ferrera MJ, Cutando A. Evaluation of Effects of Topic Melatonin on Implant Surface at 5 and 8 Weeks in Beagle Dogs. Clin Implant Dent Relat Res 2011;13:262-268

¹⁰ Ramírez-Fernández MP, Calvo-Guirado JL, de Val JE, Delgado-Ruiz RA, Negri B, Pardo-Zamora G, Peñarrocha D, Barona C, Granero JM, Alcaraz-Baños M. Melatonin promotes angiogenesis during repair of bone defects: a radiological and histomorphometric study in rabbit tibiae. Clin Oral Investig 2012 Feb 11. Doi: 10.1007/s00784-012-0684-6.

¹¹ Prieto S. Fisiología del hueso. En: Tresguerres JAF, editor. Fisiología Humana. 3º edición. Madrid: Mc-Graw-Hill; 2005. p.981-994.

¹² Guardia Muñoz J. Estudio histomorfométrico sobre el comportamiento de la melatonina en los procesos de osteointegración implantológica (Tesis Doctoral), Universidad de Granada, 2008.

¹³ Arnett, TR. Estructura y remodelado del hueso. En: J. A. Riancho Moral and J. Gonzales Macías, editors. Manual Práctico de Osteoporosis y Enfermedades del Metabolismo Mineral. Madrid: Jarpyo Editores; 2004. p. 1-6.

¹⁴ Gehron Robey P.Bone matrix proteoglycans and glucoproteins. In: Bilezikian JP, Raisz LG, and Rodan GA, editors. Principles of bone biology. 2^o edition. Volume 1. San Diego, California: Academic Press; 2002. p. 225-238.

¹⁵ Lean JM, Mackay AG, Chow JW, Chambers TJ. Osteocytic expression of mRNA for cfos and IGF-I: an immediate early gene response to an osteogenic stimulus. Am J Physiol 1996;270:937-945.

¹⁶ Takahashi N, Udagawa N, Takami M, Suda T. Cells of bone: osteoclast generation. In: Bilezikian JP, Raisz LG, and Rodan GA, editors. Principles of bone biology. 2^o edition. Volume 1. San Diego, California: Academic Press; 2002. p. 109-126.

¹⁷ Väänänen K, Zhao H. In: Bilezikian JP, Raisz LG, and Rodan GA, editors. Principles of bone biology. 2^o edition. Volume 1. San Diego, California: Academic Press; 2002. p. 127-140.

¹⁸ Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. Science 2000;289:1504-1508.

¹⁹ Garret IR, Boyce BF, Oreffo RO, Bonewald L, Poser J, Mundy GR. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone *in vitro* and *in vivo*. J Clin Invest 1990;85:632-639.

²⁰ Fallon M, Silverton S, Smith P, Moskal T, Constantinescu C, Feldman R, Golub E, Shapiro I. The oxidative metabolism of isolated osteoclasts is regulated by calcitropic agents. J Bone Miner Res 1986;Abstr.1.

²¹ Hallen JM, Raisanen S, Salo JJ, Reddy SV, Roodman GD, Hentunen TA, Lehenkari PP, Kaija H, Vihko P, Väänänen HK. Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. J Biol Chem 1999;274:22907-22910.

²² Verfaillie CM. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. Trends Cell Biol 2002;12:502-508.

²³ Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. Radiat Res 1961;14:213-222.

²⁴ Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. J Embryol Exp Morphol 1966;16:381-390.

²⁵ Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968;6:230-247.

²⁶ Dominici M, Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop DJ, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. Cytotherapy 2006;8:315-317.

²⁷ Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kapoor N, Meyers P, Chiarieri D, McKenzie S, Broxmeyer HE, Moore MA. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. Blood 1980;56:289-301.

²⁸ Coelho MJ, Fernandes MH. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. Biomaterials 2000;21:1095–1102.

²⁹ Sugiura F, Kitoh H, Ishiguro N. Osteogenic potential of rat mesenchymal stem cells after several passages. Biochem Biophys Res Commun 2004;316:233–239.

³⁰ Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999;284:143-147.

³¹ Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. Tissue Eng 1998;4:415-428.

³² Mc Cord CP, Allen FB. Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation. J Exp Zool 1917;23:207-224.

³³ Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. J Am Chem Soc 1958;80:2587.

³⁴ Guerrero J, Carrillo-Vico A, Lardone P. La melatonina. Investigación y Ciencia 2007;373:30-38.

³⁵ Simonneaux V, Ribelayga C. Generation of the Melatonin Endocrine Message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. Pharmacol Rev 2003;55:325-395.

³⁶ Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowski T, Bubenik GA. Role of melatonin in upper gastrointestinal tract. J Physiol Pharmacol 2007;58:23-52.

³⁷ Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJM, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R. Melatonin. Nature's most versatile biological signal? FEBS Journal 2006;273:2813-2838. ³⁸ Vanecek J. Melatonin binding sites. J Neurochem 1988;51:1436-1440.

³⁹ Cajochen C, Kräuchik, Wirz-Justice A. Role of Melatonin in the regulation of Human Circadian Rhytms and Sleep. J Neuroendocrinol 2003;15:432-437.

⁴⁰ Acuña-Castroviejo D, Pablos MI, Menéndez-Peláez A, Reiter RJ. Melatonin receptors in purified cell nuclei of liver. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 1993;82:253-256.

⁴¹ Hirose T, Smith RJ, Jetten AM. The third member of RZR/ROR orphan receptor subfamily that is highly expressed in skeletal muscle. Biochem Biophys Res Commun 1994;205:1976-1983.

⁴² Carlberg C, Hooft van Huijsduijnen R, Staple J, DeLamater JF, Becker-André M. RZRs, a novel class of retinoid related orphan receptor that function as both monomers and homodimers. Mol Endocrinol 1994;8:757-770.

⁴³ Dubocovich ML, Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonina receptors in mammals. Endocrine 2005;27:101-110.

⁴⁴ Fuentes Broto L. Melatonina como protector frente a los radicales libres en la hepatotoxicidad por ácidos biliares (Tesis Doctoral), Universidad de Zaragoza, 2008.

⁴⁵ Anton-Tay F, Ramirez G, Martínez I, Benitez-King G. In vitro stimulation of protein Kinase C by melatonin. Neurochem Res 1998;23:601-606.

⁴⁶ Huerto-Delgadillo L, Antón-Tay F, Benitez-King G. Effects of melatonin on microtube assembly depend on hormone concentration: Role of melatonin as a calmodulin antagonist. J Pineal Res 1994;17:55-62.

⁴⁷ Macias M, Escames G, León J, Coto A, Sbihi Y, Osuna A, Acuña-Catroviejo D. Calreticulin-melatonin. An unexpected relationship. Eur J Biochem 2003;270:832-840.

⁴⁸ Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Tamura H, Reiter RJ. Melatonin as a naturally occurring co-substrate of quinone reductase-2, the putative MT3 melatonin membrane receptor: hypothesis and significance. J Pineal Res 2007;43:317-320.

⁴⁹ Benitez-King G, Rios A, Martinez A, Antón-Tay F. In vitro inhibition of CA2+/calmodulin- dependent Kinasa II activity by melatonin. Biochim Biophys Acta 1996;1290:191-196.

⁵⁰ Hardeland R, Poeggeler B. Actions of melatonin, it's structural and functional analogs in the Central Nervous System and the significance of metabolism. Cent Nerv Syst Agents Med Chem 2007;7:289-303.

⁵¹ Hardeland R. Melatonin, hormone of darkness and more: occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. Cell Mol Life Sci 2008;65:2001-2018.

⁵² Reiter RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. Endocrine Rev 1991;12:151-180.

⁵³ Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Zhang M, Weintraub ST, Cabrera J, Sainz RM, Mayo JC. Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: Its origin and significance. Biochim Biophys Acta 1999;1472:206-214.

⁵⁴ Acuña-Catroviejo D, Escames G, Carazo A, Leon J, Khaldy H, Reiter RJ. Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitocondrial-related diseases. Curr Topics Med Chem 2002;2:133-151.

⁵⁵ Reiter RJ. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. Experentia 1993;49:654-664.

⁵⁶ Moore RY. Suprachiasmatic nucleus in sleep-wake regulation. Sleep Med 2007;8:27-33.

⁵⁷ Ianas O, Olnescu R, Badescu I. Melatonin involvement in oxidative stress. Rom J Endocrinol 1991;29:147-153.

⁵⁸ Cuesta S, Kireev R, García C, Forman K, Escames G, Vara E, Tresguerres JA. Beneficial effect of melatonin treatment on inflammation, apoptosis and oxidative stress on pancreas of a senescence accelerated mice model. Mech Ageing Dev 2011;132:573-582.

⁵⁹ Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ. Melatonin; A potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. Endocr J 1993;1:57-60.

⁶⁰ Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchoni R, Marcheselli F. Melatonin: A peroxyl radical scavenger more potent tan vitamin E. Life Sci 1994;55:271-276.

⁶¹ Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, López-BurilloS, Sainz RM, Mayo JC. Melatonin: detoxification of oxygen and nitrogen-based toxic reactants. Adv Exp Med Biol 2003;527:539-548.

⁶² Costa EJX, Lopes RH, Lamy-Freund MT. Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. J Pineal Res 1995;19:123-126.

⁶³ Poeggeler B, Saarela S, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, Manchester LC, Barlow-Walden LR. Melatonin a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: New aspects of the oxidation chemistry of this indole assessed *in vitro*. Ann N Y Acad Sci 1994;738:419-420.

⁶⁴ Mayo JC, Sainz RM, Tan DX, Hardeland R, Leon J, Rodriguez C, Reiter RJ. Antiinflamatory actions of melatonin and its metabolites, N1 acetyl-N2-formyl-5methoxykynuramine (AFMK), and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK) in macrophages. J Neuroimmunol 2005;165:139-149. ⁶⁵ Guerrero JM, Reiter RJ. Melatonin-Immune System Relationships. Curr Topics Med Chem 2002;2:167-179.

⁶⁶ García-Maurino S, González-Haba MG, Calvo JR, Goberna R, Guerrero JM. Involvement of nuclear bindings sites for melatonin in the regulation of IL-2 and IL-6 production by human blood mononuclear cells. J Neuroimmunol 1998;92:76-84.

⁶⁷ García-Maurino S, González-Haba MG, Calvo JR, Rafii El Idrissi M, Sánchez-Margalet V, Goberna R, Guerrero JM. Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. J Immunol 1997;159:574-581.

⁶⁸ Cardinali DP, Ladizesky MG, Boggio V, Cutrera RA, Mautalen C. Melatonin effects on bone: experimental facts and clinical perspectives. J Pineal Res 2003;34:81-87.

⁶⁹ Soybir G, Topuzlu C, Odabas O, Dolay K, Bilir A, Köksoy F. The effects of melatonin on angiogenesis and wound healing. Surg Today 2003;33:896-901.

⁷⁰ Pugazhenthi K, Kapoor M, Clarkson AN, Hall I, Appleton I. Melatonin accelerates the process of wound repair in full-thickness incisional wounds. J Pineal Res 2008;44:387-396.

⁷¹ Tresguerres IF, Clemente C, Blanco L, Khraisat A, Tamimi F, Tresguerres JA. Effects of Local Melatonin Application on Implant Osseointegration. Clin Implant Dent Relat Res 2010 Apr 23. Doi: 10.1111/j.1708-8208.2010.00271.x.

⁷² Calvo-Guirado, Ramírez-Fernández MP, Gómez-Moreno G, Maté-Sánchez JE, Delgado-Ruiz R, Guardia J, López-Marí L, Barone A, Ortiz-Ruiz AJ, Martínez-González JM, Bravo LA. Melatonin stimulates the growth of new bone around implants in the tibia of rabbits. J Pineal Res 2010;49:356-363.

⁷³ Calvo-Guirado JL, Gómez-Moreno G, Barone A, Cutando A, Alcaraz-Baños M, Chiva F, López-Marí L, Guardia J. Melatonin plus porcine bone on discrete calcium deposit implant surface stimulates osteointegration in dental implants. J Pineal Res 2009;47:164-172.

⁷⁴ Calvo-Guirado JL, Gómez-Moreno G, López-Marí L, Guardia J, Marínez-González JM, Barone A, Tresguerres IF, Paredes SD, Fuentes-Breto L. Actions of melatonin mixed with collagenized porcine bone versus porcine bone only on osteointegration of dental implants. J Pineal Res 2010;48:194-203.

⁷⁵ Muñoz F, López-Peña M, Miño N, Gómez-Moreno G, Guardia J, Cutando A. Topical Application of Melatonin and Growth Hormone Accelerates Bone Healing around Dental Implants in Dogs. Clin Implant Dent Relat Res 2012;14:226-235.

⁷⁶ Kotlarczyk MP, Lassila HC, O'Neil CK, D'Amico F, Enderby LT, Witt-Enderby PA, Balk JL. Melatonin osteoporosis prevention study (MOPS): a randomized, double-blind,

placebo-controlled study examining the effects of melatonin on bone health and quality of life in perimenopausal women. J Pineal Res 2012;52:414-426.

⁷⁷ Egermann M, Gerhardt C, Barth A, Maestroni GJ, Schneider E, Alini M. Pinealectomy affects bone mineral density and structure-an experimental study in sheep. BMC Musculoskelet Disord 2011;12:271.

⁷⁸ Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Brzezinski A, Bhatnagar KP, Cardinali DP. Melatonin, immune function and cancer. Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov 2011;5:109-123.

⁷⁹ Seely D, Wu P, Fritz H, Kennedy DA, Tsui T, Seely AJ, Mills E. Melatonin as Adjuvant Cancer Care With and Without Chemotherapy: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Trials. Integr Cancer Ther 2011 Oct 21. Doi: 10.1177/1534735411425484.

⁸⁰ Erren T.C. Light, timing of biological rhythms and chronodisruption in man. Naturwissenschaften 2003;90:485-494.

⁸¹ Dumont M, Lanctôt V, Cadieux-Viau R, Paquet J. Melatonin production and light exposure of rotating night workers. Chronobiol Int 2012;29:203-210.

⁸² Siegrist C, Benedetti C, Orlando A, Beltrán JM, Tuchscherr L, Noseda CM, Brusco LI, Cardinali DP. Lack of changes in serum prolactin, FSH, TSH, and estradiol after melatonin treatment in doses that improve sleep and reduce benzodiazepine consumption in sleep-disturbed, middle-aged, and elderly patients. J Pineal Res 2001;30:34-42.

⁸³ Lemoine P, Garfinkel D, Laundon M, Nir T, Zisapel N. Prolonged-release melatonin for insomnia - an open-label long-term study of efficacy, safety, and withdrawal. Ther Clin Risk Manag 2011;7:301-311.

⁸⁴ Mallow B, Adkins KW, McGrew SG, Wang L, Goldman SE, Fawkes D, Burnette C. Melatonin for Sleep in Children with Autism: A Controlled Trial Examining Dose, Tolerability, and Outcomes. J Autism Dev Disord 2012 Mar 9. Doi: 10.1007/s10803-011-1418-3.

⁸⁵ Melamud L, Golan D, Luboshitzky R, Lavi I, Miller A. Melatonin dysregulation, sleep disturbances and fatigue in multiple sclerosis. J Neurol Sci 2012;314:37-40.

⁸⁶ Igaz P, Tulassay Z. Clinical picture and treatment of jet lag. Orv Hetil 2011;152:2021-2024.

⁸⁷ Herxheimer A, Petrie KJ. Melatonin for the prevention and treatment of jet lag. Cochrane Database Syst Rev 2002;CD001520. ⁸⁸ Lewy AJ, Bauer VK, Cutler NL, Sack RL. Melatonin treatment of winter depression: a pilot study. Psychiatry Res 1998;77:57-61.

⁸⁹ Drago F, Busa L. Acute low doses of melatonin restore full sexual activity in impotent male rats. Brain Res 2000;878:98-104.

⁹⁰ Zarazaga LA, Gatica MC, Celi I, Guzmán JL, Malpaux B. Effect of melatonin implants on sexual activity in Mediterranean goat females without separation from males. Theriogenology 2009;72:910-918.

⁹¹ McIntyre IM, Norman TR, Burrows GD, Amstrong SM. Melatonin rhythm in human plasma and saliva. J Pineal Res 1987;4:177-183.

⁹² Vakkuri O. Diurnal rhythm of melatonin in human saliva. Acta Physiol Scand 2004;124:409-412.

⁹³ Gómez-Moreno G, Guardia J, Ferrera MJ, Cutando A, Reiter RJ. Melatonin in diseases of the oral cavity. Oral Dis 2010;16:242-247.

⁹⁴ Cutando A, Gómez-Moreno G, Arana C, Acuña-Castroviejo D, Reiter RJ. Melatonin: potential functions in the oral cavity. J Periodontol 2007;78:1094-1102.

⁹⁵ Naguib M, Gottumukkala V, Goldstein P. Melatonin and anesthesia: A clinical Perspective. J Pineal Res 2007;42:12-21.

⁹⁶ Cutando A, Gómez-Moreno G, Villalba J, Ferrera MJ, Escames G, Acuña-Castroviejo D. Relationship between salivary melatonin levels and periodontal status in diabetic patients. J Pineal Res 2003;35:239-244.

⁹⁷ Cutando A, Gómez-Moreno G, Galindo P, Arana C, Bolaños MJ, Acuña-Castroviejo D, Wang HL. Relationship between salivary melatonin and severity of periodontal disease. J Periodontol 2006;77:1533-1538.

⁹⁸ Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983;65:55-63.

⁹⁹ Denizot F, Lang R. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J Immunol Methods 1986;89:271-277.

¹⁰⁰ Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. Biotechnol Lett 2004;26:509-515.

¹⁰¹ Juknat AA, Mendez MDELV, Quaglino A, Fameli CI, Mena M, Kotler ML. Melatonin prevents hydrogen peroxide-induced Bax expression in cultured rat astrocytes. J Pineal Res 2005;38:84-92.

¹⁰² Suzuki N, Somei M, Seki A, Reiter RJ, Hattori A. Novel bromomelatonin derivatives as potentially effective drugs to treat bone diseases. J Pineal Res 2008;45:229-234.

¹⁰³ Radio NM, Doctor JS, Witt-Enderby PA. Melatonin enhances alkaline phosphatase activity in differentiating human adult mesenchymal stem cells grown in osteogenic medium via MT2 melatonin receptors and the MEK/ERK (1/2) signaling cascade. J Pineal Res 2006;40:332-342.

¹⁰⁴ Satomura K, Tobiume S, Tokuyama R, Yamasaki Y, Kudoh K, Maeda E, Nagayama M. Melatonin at pharmacological doses enhances human osteoblastic differentiation in vitro and promotes mouse cortical bone formation in vivo. J Pineal Res 2007;42:231-239.

¹⁰⁵ Zhang L, Su P, Xu C, Chen C, Liang A, Du K, Peng Y, Huang D. Melatonin inhibits adipogenesis and enhances osteogenesis of human mesenchymal stem cells by suppressing PPARγ expression and enhancing Runx2 expression. J Pineal Res 2010;49:364-372.

¹⁰⁶ Sethi S, Radio NM, Kotlarczyk MP, Chen CT, Wei YH, Jockers R, Witt-Enderby PA. Determination of the minimal melatonin exposure required to induce osteoblast differentiation from human mesenchymal stem cells and these effects on downstream signaling pathways. J Pineal Res 2010;49:222-238.

¹⁰⁷ Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. Endocrine Rev 2000;21:115-137.

¹⁰⁸ Collin-Osdoby P, Li L, Rothe L, Anderson F, Kirsch D, Oursler MJ, Osdoby P. Inhibition of avian osteoclast bone resorption by monoclonal antibody 121F: a mechanism involving the osteoclast free radical system. J Bone Miner Res 1998;13:67-78.

¹⁰⁹ Reiter RJ, Tan DX, Allegra M. Review. Melatonin: Reducing molecular pathology and dysfunction due to free radicals and associated reactants. Neuro endocrinol Lett 2002;23:3-8.

¹¹⁰ Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter RJ, Miyahara Y. Melatonin reduces oxidative damage of neural lipids and proteins in senescence-accelerated mouse. Neurobiol Aging 2002;23:639-644.

¹¹¹ Ladizesky MG, Cutrera RA, Boggio V, Somoza J, Centrella JM, Mautalen C, Cardinali DP. Effect of melatonin on bone metabolism in ovariectomized rats. Life Sci 2001;70:557-565.

¹¹² Haase HR, Ivanovski S, Waters MJ, Bartold PM. Growth hormone regulates osteogenic marker mRNA expression in human periodontal fibroblasts and alveolar bone-derived cells. J Periodontal Res 2003;38:366-374.
¹¹³ Sabokbar A, Millett PJ, Myer B, Rushton N. A rapid, quantitative assay for measuring alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells in vitro. Bone Miner 1994;27:57-67.

¹¹⁴ Paul H, Reginato AJ, Schumacher HR. Alizarin red S staining as a screening test to detect calcium compounds in synovial fluid. Arthritis Rheum 1983;26:191-200.

ABSTRACT

1. INTRODUCTION

Bone is a functional and active tissue and so has capacities for regeneration and functional adaptation. The structural integrity of bone is dependent upon a dynamic balance between the activity of bone-resorbing osteoclasts and bone-forming osteoblasts, known as the remodeling process. Through this constant remodeling process, bone is continuously degraded and replaced with new bone. As humans age, osteoblast activity begins to diminish because of reduced reproductive and biosynthetic potentials. This complex process is regulated by hormonal signals (PTH, calcitonina, etc.) in turn modulated by local bone remodeling control factors (RANKL, RANK, OPG, mechanical stimulants, etc.), which work to maintain an equilibrium.

Bone healing is a complex process involving cell proliferation, angiogenesis, blood circulation and matrix remodeling, of which angiogenesis is the most crucial. It is regulated by several growth factors including VEGF and Inducible Nitric Oxide Synthase.

Melatonin is a hormone released from the pineal gland in response to darkness; conversely, it is inhibited by light. Melatonin has been implicated in osteogenesis and osteolysis through a variety of mechanisms. The effects of melatonin on bone have been attributed to its action on osteoblasts that either induces their differentiation or proliferation or inhibits osteoclast activity. It is also known that the age-related decrease in melatonin has been related to an increased risk of osteoporosis.

It is known that, starting in the postnatal period, bone marrow presents multipotent precursor cell populations involved in the maintenance of connective tissue, such as adult mesenchymal stem cells (MSCs). These undifferentiated multipotent cells are characterized by their capacity to auto-renew and differentiate into multiple mesenchymal cell lines, e.g. adipocytes, osteoblasts, chondrocytes, myocytes and fibroblasts, when the microenvironment in which they are located is optimal (presence of growth factors, cytokines, pressure of oxygen, pH, hormones, etc.). Their osteogenic potential and their capacity to differentiate into osteogenic cells in specific culture conditions are proven. For this reason, this cell type has been used alone or in combination with osteoinductive factors or osteoconductive materials for cell-based strategies for reparative purposes of connective tissue in tissue engineering.

In vitro, adult human MSCs (*ah*MSCs) undergo mainly osteogenic differentiation through a well-defined pathway. Meanwhile, the presence of exogenous molecular factors such as glucocorticoids, acorbic acid, β -glycerophosphate, bone morphogenetic proteins enhance osteoblastic differentiation, or rather, increase alkaline phosphatase (ALP) activity or gene expression, both markers related to osteogenic differentiation or osteoblastic phenotype. However, the continuous action over time of these factors involved in differentiation can bring about adverse-contrary effects, such as adipogenic differentiation (a cause of osteonecrosis in patients treated with corticosteroids over long periods) and can even lead to cellular apoptosis.

2. OBJECTIVES

The aim of this study was to observe different quantities of melatonin exposure over different time periods in order to define the ideal dose of melatonin exposure required to differentiate undifferentiated *ah*MSCs to osteoblasts. *Ah*MSCs were used as a model to analyze the continuing effect of different doses of melatonin on the capacity of differentiation to osteoblast, comparing *ah*MSCs with dexamethasone (DEX).

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. Isolation and culture of bone marrow ahMSCs.

*Ah*MSCs were isolated from bone marrow obtained by percutaneous direct aspiration from the iliac crest of three male human volunteers (50 mL/patient) in good physical condition ranging from 27 to 35 years old. The volunteers gave their informed consent in writing. The study was approved by the ethics and clinical trials committee

of the Virgen de la Arrixaca University Hospital, Murcia, where the study was performed.

The mononuclear cells were plated out in 75 cm² culture flasks (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) with 10 mL of basal culture growth medium (GM) and incubated at 37°C, in 5% CO₂ and a 95% relative humidity atmosphere to attach undisturbed for seven days. The GM used was Minimum Essential Medium (MEM) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, U.S.A.) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich) and penicillin/streptomycin (100 U/mL⁻¹ and 100 μ g/mL⁻¹ respectively) (Sigma-Aldrich).

3.2. Phenotypic Characterization of Bone Marrow-Derived ahMSCs. Flow Cytometry.

In order to confirm the identity of isolated cells, the adherent isolated cells, considered as *ah*MSCs, were tested for CD73, CD90 and CD105 marker expression and the non-expression of CD34 and CD45 hematopoietic markers.

3.3. Experiment Design

To conduct the study, six groups were established: Group I, control group of untreated *ah*MSCs; Group II, *ah*MSCs exposed to physiological doses of melatonin of 0.01 μ M; Group III, *ah*MSCs exposed to 50 μ M melatonin; Group IV, *ah*MSCs exposed to 100 μ M melatonin; group V, *ah*MSCs exposed to 150 μ M melatonin; group VI, *ah*MSCs exposed to 100 μ M DEX.

The cultivation conditions were the same for the six groups as described in 3.1.

To determine the action of melatonin on the primary culture of ahMSCs in cell proliferation and induction of osteoblastic differentiation, study periods were established at 3, 7, 14, 21 and 28 days. *Ah*MSC exposure to the different doses of melatonin and DEX was continuous throughout the study. All tests were performed at least in triplicate. Several tests were done:

- Cell proliferation assay. Cellular proliferation was evaluated by means of the 3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyletrazolium bromide assay (MTT; Sigma-Aldrich Química, Madrid, Spain).
- Contrast Phase Optical Microscopy Observation to record the evolution of

cultures, changes to their morphological features and growth under the effect of different doses of melatonin and DEX.

- Scanning electron microscopy (SEM) was used to evaluate the morphology, cell adhesion and growth of ahMSCs cultured with different doses of melatonin.
- Energy Dispersive Microanalysis was used to determine the chemical elements of which the nodules (observed by SEM) were composed, in cultures exposed to the action of melatonin and DEX.
- Flow citometry was made in order to determine the phenotypic changes in the expression of *ah*MSC surface markers before and after exposure to different concentrations of melatonin and DEX. The criteria of the International Society of Cellular Therapy were applied: the presence of clusters of differentiation (CD) CD73, CD90 and CD105 and the absence of hematopoietic markers CD34 and CD45.
- Alkaline phosphatase production was determined as a marker of osteoblastic differentiation.
- Calcium deposition. The presence of calcium deposition in cultures was evaluated qualitatively by selective binding of Alizarin Red Staining.
- Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). It was done to study the expression of OCT-4, collagen type I, osteocalcine and GADPH genes.
- Statistical Analysis. Differences in outcome parameters were analyzed using the ANOVA. All pairwise multiple comparison procedures were performed applying the Bonferroni correction. For mean values Welch and Brown-Forsythe tests were applied. P values of <0.05 were considered significant.

4. **RESULTS**

4.1. Isolation and culture of bone marrow *ah*MSCs.

During the first 3 hours in culture, abundant blood cells could be observed, nonadherent cells with a few larger, round shaped or slightly elongated attached to plastic. After seven days, the culture medium was renewed, in this way, removing the nonadherent hematopoietic cells and selecting the ahMSCs given their proven capacity for attaching to the plastic of culture flasks. Once the cells were confluent, they were subcultured.

4.2. Phenotypic Characterization of Bone Marrow-Derived ahMSCs.

The identity of isolated cells from primary culture was confirmed by flow citometry. Cells expressed membrane markers CD75, CD105 and CD90 and did not expressed CD34 and CD45.

4.3. Cell proliferation assay

Melatonin did not inhibit *ah*MSCs proliferation, it showed higher absorbance levels at 28 days when compared to control and DEX groups. The kinetics of growth of *ah*MSCs was higher in the seed at a density of 1500 cells per well (96-well plate).

4.4. Contrast Phase Optical Microscopy Observations

At 7 days, the cells formed aggregates or colonies consisting of 25-40 cells; their morphology generally consisted of elongated and polygonal shapes. Finally, after 28 days, cells showed a fibroblast-like morphology and they grew forming a carpet, covering the whole surface of the flask.

When cultured cells were subjected to the action of melatonin, morphology behavior varied according to the dose and the duration of its action. The most remarkable findings were observed with doses of 0.01, 50 and 100 μ M after 7 days of treatment where cell cultures treated with melatonin proliferated faster than with DEX and in comparison to untreated control cells. At 28 days all cultures, regardless of the dose, reached confluence without significant morphological differences. The morphological appearance of *ah*MSCs did not vary between treatments and only small deposits of refractive material were noted in the cultures with DEX.

4.5. Scanning Electron Microscopy.

After 3 days it was found isolated cultured cells in the absence of melatonin

(control group) that showed a rounded shape and were clustered to form colonies. At 7 days, *ah*MSCs had a flattened and elongated appearance with the presence of cytoplasmic prolongations. At day 14, when the cell culture had reached confluency, *ah*MSCs adopted a spindle-shaped and polygonal morphology with widespread cytoplasmic extensions (filopodia). Finally, between days 21 and 28, cell proliferation formed a continuous carpet and it had become difficult to recognize the cells individually.

At 3 days, the *ah*MSCs undergoing treatment with melatonin had a similar appearance to the controls. At 7 days, the cells showed morphological characteristics similar to those in the control group. Unlike the control, the number of cells and therefore the degree of confluence was greater. Morphological variations between groups subjected to the action of different doses of melatonin were not observed. However, after 28 days, when they reached confluence, *ah*MSCs changed their morphology, becoming more flattened and spindle-shaped with a tendency to align in the same direction. In this period, the nodules of mineralization isolated from cultures treated with melatonin 50 μ M, 100 μ M and DEX were notable.

4.6. Energy Dispersive Microanalysis

The spectrum showed birefringence nodules highlighting a peak that corresponds to phosphorus and a lower intensity for calcium, while the adjacent peaks correspond to spectral artifacts caused by different elements. This spectrum proved the presence of a calcium-like material indicating mineral apatite bone tissue fraction.

4.7. Alkaline phosphatase activity

The group of melatonin 50 μ M is the one which obtains best results, especially after 21 and 28 days of treatment.

4.8. Alizarin red staining

All cultures treated with melatonin (0.01 μ M, 50 μ M, 100 μ M y 150 μ M) and DEX (100 μ M) were alizarin red positives at 21 and 28 days.

4.9. Flow Cytometry

Melatonin, at a physiological concentration of 0.01 μ M, induced a significant (p<0.05) decrease in the expression of CD105 (p=0.001), CD73 (p=0.0005) and CD90 (p=0.0005) at 7, 14 and 21 days of continuous treatment in comparison with cells treated for 3 days. Treatment of ahMSCs with 50 μ M of melatonin produced a significant (p<0.05) decrease in the expression of CD105 (p=0.001), CD73 (p=0.001) and CD90 (p=0.002) at 7, 14 and 21 days of continuous treatment in comparison with 3 days. Treatment with 100 μ M of melatonin produced statistically significant (p<0.05) differences in expression of CD105 (p=0.002), CD73 (p=0.009), and CD90 (p=0.002) at 7, 14 and 21 days of continuous treatment in CD90 (p=0.002) at 7, 14 and 21 days of continuous treatment in cD90 (p=0.002) at 7, 14 and 21 days of continuous treatment in comparison with 3 days. Treatment with 100 μ M of melatonin produced statistically significant (p<0.05) differences in expression of CD105 (p=0.002), CD73 (p=0.009), and CD90 (p=0.002) at 7, 14 and 21 days of continuous treatment in comparison with 3 days. Treatment with 150 μ M melatonin levels produced very similar results to the dose of 50 μ M. Finally, the treatment of ahMSCs with DEX did not produce modifications (p <0.05) in the expression of the markers CD105, CD73 and CD90 at 7, 14 and 21 days of continuous treatment with respect to 3 days. However, after 21 days of treatment, for CD90 a greater decrease in expression was detected, this being statistically significant (p <0.05) in comparison with the CD105 and CD73.

4.10. Real-time PCR.

Collagen type I expression analyzed for all doses and all study periods was significantly higher ($p \le 0.05$) between 14 and 21 days, particularly in the cultures exposed to dosed of 100 µM and 50 µM. When osteocalcine expression was analyzed, significant variations were found in all cases of cultures exposed to the dose of 100 µM of melatonin between 7 and 14 days, diminishing during the third week. This also occurred with the 0.01 µM dose between the 3 day study time and the first week and the 3 day study time and the second week. For the rest of the doses, no significant variations were observed between study times. Oct-4 expression was low and without significant variations for all doses and at all study times.

5. CONCLUSIONS

- 1. The best density of cell culture is 1500 cells per well (of a 96-well plate).
- 2. Melatonin at 50 µm helps *ah*MSCs to differentiate because:
 - a. It diminishes the expression of membrane markers (cluster differentiation) CD105, CD90 y CD73, characteristic of MSCs.
 - b. It raises the levels of alkaline phosphatase production.
 - c. It helps cells to produce calcium like deposits.
 - d. It increases the expression of collagen type I and osteocalcine gens and it diminishes the expression of OCT-4 gen.
- 3. The study findings demonstrate that continuous exposure to melatonin induces osteoblast differentiation from *ah*MSCs and that this may lead to an enhancement in bone formation *in vivo*.
- 4. The melatonin behaves as a cytocompatible and bioactive material able to induce osteoblastic differentiation of *ah*MSCs, which would contribute to the quick bonding of the materials to the receptor bone *in vivo*. So, melatonin should be an effective substrate promoter of bone tissue regeneration suitable for bioengineering of bone tissue.