



FACULTAD DE ENFERMERÍA
Y TERAPIA OCUPACIONAL

Grado en Enfermería

Trabajo Fin de Grado

EFFECTOS DEL ETANOL SOBRE LA PROLIFERACIÓN
DE CULTIVOS DE CÉLULAS DE OSTEOSARCOMA:
POSIBLE PAPEL PROTECTOR DE DIFERENTES
ISOFLAVONAS.

Autora: Olga Leal Hernández

Tutora: M^a Luz Canal Macías

Cáceres, Junio 2014

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN Y PALABRAS CLAVE.	1
ABSTRACT AND KEYWORDS.	3
1.- INTRODUCCIÓN	5
1.1. Tejido óseo	5
1.1.1. Las células del tejido óseo	5
1.1.1.1. Osteoblastos	6
1.1.1.2. Osteocitos	6
1.1.1.3. Osteoclastos	7
1.2. Etanol y Salud Ósea	7
1.3. Isoflavonas y Salud Ósea	9
1.3.1. Tipos de isoflavonas	10
1.3.1.1. Genisteína	10
1.3.1.2. Daidzeína	11
1.3.1.3. Formononetina	12
1.4. Cultivo Celular MG-63	12
1.5. Isoflavonas, etanol y cultivos celulares	12
2.- OBJETIVOS	15
3.- METODOLOGÍA.	17
3.1. Línea celular de osteoblastos humanos	17
3.2. Estudio de proliferación celular con MTT	18

4.-RESULTADOS / DESARROLLO.	21
4.1. Curvas dosis/respuesta de etanol sobre la viabilidad de los cultivos de células MG-63	21
4.2. Curvas dosis/respuesta de diferentes isoflavonas sobre la viabilidad de células MG-63	23
4.2.1. Curva dosis/respuesta de la Genisteína sobre la viabilidad de células MG-63	23
4.2.2. Curva dosis/respuesta de la Daidzeína sobre la viabilidad de células MG-63.	24
4.2.3. Curva dosis/respuesta de la Formononetina sobre la viabilidad de células MG-63	25
4.3. Estudio del posible efecto protector de diferentes isoflavonas sobre la muerte celular inducida por etanol en células MG-63	27
5.- DISCUSIÓN	29
6.- CONCLUSIONES	31
7.- LÍNEAS FUTURAS	33
8.- AGRADECIMIENTOS	35
9.- BIBLIOGRAFÍA	37

RESUMEN

Introducción: El consumo de alcohol ha aumentado considerablemente en los últimos tiempos. Su efecto nocivo sobre la salud ósea ha sido motivo de estudio en diferentes investigaciones, sin embargo, existe cierta controversia sobre el beneficio de algunas bebidas alcohólicas por otros componentes diferentes al etanol, como las isoflavonas.

Hipótesis: Las hipótesis iniciales de este estudio son que el etanol disminuye la viabilidad de las células óseas, pero que en asociación con las isoflavonas los efectos en la proliferación son positivos.

Material y métodos: Para la comprobación de dichas hipótesis se ha desarrollado un estudio in vitro con células de osteoblastos MG-63 con diferentes concentraciones de etanol y de isoflavonas. Los resultados de viabilidad se han medido con la técnica MTT y analizado con la prueba estadística Kruskal-Wallis y el test de Scheffé.

Resultados: Se comprobó el efecto nocivo del etanol sobre las células óseas. Al 1% de etanol, obtenemos una viabilidad del $67.71\% \pm 16.84$ ($P < 0.001$). Con las isoflavonas utilizadas, a diferentes concentraciones, obtuvimos diferentes resultados. Tomamos un valor de referencia de cada uno para su posterior estudio junto con el etanol. Genisteína $10\mu\text{M}$ con una viabilidad de $95.76\% \pm 24.93$ ($p > 0.05$), Daidzeína $1\mu\text{M}$ con una viabilidad de $110.322\% \pm 24.678$ y una $p = 0.99$ y por último formononetina $100\mu\text{M}$ con una viabilidad de $103.46\% \pm 23.79$ ($p > 0.05$). Con la combinación Genisteína $10\mu\text{M}$ + etanol 1% se obtuvo una viabilidad del $83.62\% \pm 22.93$ con una $p = 0.057$. En el segundo caso Daidzeína $1\mu\text{M}$ + etanol 1% se obtuvo una viabilidad del $81.98\% \pm 19.75$ con una $p < 0.05$. En el tercer caso Formononetina $100\mu\text{M}$ + etanol 1% se obtuvo una viabilidad del $84.46\% \pm 24.28$ con una $p = 0.08$.

Conclusiones: Con los resultados obtenidos sacamos las siguientes conclusiones. El etanol disminuye la viabilidad del cultivo celular MG63. Las isoflavonas aumentan la viabilidad del cultivo celular MG63. Las isoflavonas, en combinación con el etanol, parecen tener un efecto protector ya que aumenta la viabilidad de las células en comparación con el efecto del etanol absoluto, a excepción de la Daidzeína.

PALABRAS CLAVE: Etanol, Isoflavonas, Osteoblastos, Cultivos celulares MG-63, Viabilidad.

ABSTRACT

Introduction: Alcohol consumption has increased considerably during the last years. His harmful effect on bone health has been cause for study in different researchs, however, there is some controversy about the benefit of some alcoholic drinks by other components different to ethanol, like isoflavones.

Hypothesis: The initial hypotheses of this study are that ethanol reduces the viability of bone cells, but that the effects on proliferation in association with isoflavones are positive.

Material and methods: To test these hypotheses, an in vitro study has been developed with osteoblasts cells MG-63 with different concentrations of ethanol and isoflavonas. The viability results have been measured with MTT technique and analyzed with the Kruskal-Wallis and Scheffé test.

Results: We proved the harmful effect of ethanol on bone cells. With 1% of ethanol, we obtain a viability of the $67.71\% \pm 16.84$ ($P < 0.001$). With used isoflavones, at different concentrations, we got different results. We take a reference value of each one to study along with ethanol. Genistein $10\mu\text{M}$ with a viability of $95.76\% \pm 24.93$ ($p > 0.05$), Daidzein $1\mu\text{M}$ with a viability of $110.322\% \pm 24.678$ and $p = 0.99$ and finally Formononetin $100\mu\text{M}$ with a viability of $103.46\% \pm 23.79$ ($p > 0.05$). With the combination Genistein $10\mu\text{M}$ + ethanol 1% was obtained a viability of the $83.62\% \pm 22.93$ with a $p = 0.057$. In the second case Daidzein $1\mu\text{M}$ + ethanol 1% was obtained a viability of the $81.98\% \pm 19.75$ with a $p < 0.05$. In the third case Formononetin $100\mu\text{M}$ + ethanol 1% was obtained a viability of the $84.46\% \pm 24.28$ with a $p = 0.08$.

Conclusions: With the obtained results we get the following conclusions. Ethanol decreases the viability of MG63 cell culture. Isoflavones increase the viability of MG63 cell culture. Isoflavones, in combination with ethanol, seem to have a protective effect, since it increases the viability of cells in comparison with the effect of absolute ethanol, except Daidzein.

KEYWORDS: Ethanol, Isoflavones, Osteoblast, Cells cultivation MG-63, Viability.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1. Tejido óseo

El tejido óseo es el principal componente del esqueleto adulto y constituye uno de los mayores sistemas del organismo. Es un tejido dinámico, que consta de un componente celular y una matriz orgánica calcificada. Además de proporcionar protección a los órganos vitales y el apoyo estructural para los músculos, ligamentos y tendones, el hueso es el principal reservorio de iones esenciales, ofrece un lugar de apoyo para la hematopoyesis y regula el metabolismo (McGee-Lawrence y Westendorf, 2011, Ksiezopolska, 2010).

El esqueleto humano se compone de 213 huesos propiamente formados, los cuales, presentan formas y tamaños diferentes pero poseen una estructura común. Una corteza con una mayor densidad que constituye el hueso compacto o cortical cuya superficie interna se halla en continuidad con hueso menos denso y de aspecto esponjoso o hueso trabecular. Entre el hueso cortical, que viene a representar el 80% del total del hueso y el trabecular, que constituye el 20% restante, no existen límites perfectamente marcados, sólo pequeñas zonas de transición (Bostrom, 2000).

1.1.1. Las células del tejido óseo

El componente celular del tejido óseo lo forman tres poblaciones bien definidas:

- Los osteoblastos: células responsables de la formación de tejido.
- Los osteocitos: células principales del tejido adulto.
- Los osteoclastos: células responsables de la resorción del tejido óseo.

Todas estas células tienen un origen común y proceden de un “pool” de células madres mesenquimatosas indiferenciadas y pluricelulares, las cuales, se multiplican y diferencian, en los tres tipos mencionados. Las células óseas están organizadas en unidades especiales llamadas *unidades óseas multicelulares* (Bone Multicellular Units; BMUs) (Eriksen, 2010; Papachroni y col., 2009; Kassen y col., 2008; Frost, 2001). La principal función de estas BMUs es mediar en la remodelación ósea, manteniendo la integridad del esqueleto a través de repetitivos ciclos de resorción y formación de hueso (Eriksen, 2010; Kassen y col., 2008; Frost, 2001; Parfitt, 1991).

1.1.1.1. Osteoblastos

Los osteoblastos son las células responsables de sintetizar y secretar la matriz ósea y se localizan en las superficies activas del hueso (Yonezawa y col., 2011; Manolagas, 2000; Ducky y Karsenty, 1998). Morfológicamente los osteoblastos tienen un cuerpo celular cúbico o prismático del que nacen prolongaciones citoplasmáticas más o menos alargadas.

Poseen un núcleo redondeado situado en el extremo que se halla más alejado de la superficie ósea sobre la que se asientan y con un nucleolo voluminoso. El citoplasma, rico en ribosomas libres y mitocondrias, presenta abundantes cisternas de retículo endoplasmático rugoso y un aparato de Golgi yuxtannuclear bien desarrollado (Lian y col., 1999). Estas características son típicas de aquellas células con capacidad para segregar grandes cantidades de proteínas (Puzas, 1996).

Cuando los osteoblastos terminan con la fase de formación de hueso, pueden quedarse en la superficie como células de revestimiento óseo, o bien, se rodean a sí mismas con la matriz convirtiéndose en osteocitos (Eriksen, 2010).

1.1.1.2. Osteocitos

Los osteocitos derivados de los osteoblastos por diferenciación, forman parte del tejido óseo adulto y constituyen más del 90% de las células del hueso humano maduro (Eriksen, 2010). Los osteocitos están encargados de mantener la integridad estructural de la matriz mineralizada. Intervienen además, en la liberación o depósito de calcio para el mantenimiento de la homeostasis del calcio en el cuerpo y expresan moléculas específicas que controlan la formación de hueso y el metabolismo del fosfato, tales como, la proteína de matriz dentinaria 1 (DMP-1), el factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF-23) y la esclerostina (Eriksen, 2010; Bonewald, 2006).

Morfológicamente, el cuerpo celular de los osteocitos está caracterizado por ser fusiforme o estrellado, da nacimiento a numerosas y finas prolongaciones tubulares más o menos alargadas, conectadas entre sí y con células de la superficie (osteoblastos). Estas conexiones permiten sentir a las células cómo se deforma el hueso debido a las fuerzas mecánicas, y coordinar el proceso de remodelado (Lian y col., 1999; Boivin y col., 1990); su muerte por microfisuras se ha sugerido como el evento principal en el inicio de la resorción osteoclástica del hueso (Eriksen, 2010; Cardoso y col., 2009). Su citoplasma contiene los mismos orgánulos que los osteoblastos pero en menor cantidad, al tener una capacidad metabólica escasa,

aunque su presencia parece necesaria para mantener las propiedades biomecánicas del tejido óseo. La cavidad de la matriz ósea que contiene el cuerpo celular del osteocito se denomina laguna osteocitaria y los diminutos canalículos que albergan sus prolongaciones citoplasmáticas reciben el nombre de conductos calcóforos. El estudio de la ultraestructura del osteocitos muestra que esta población celular posee un aparato de Golgi y un retículo endoplasmático rugoso menos desarrollado que los osteoblastos. Estas organelas se concentran en el cuerpo celular donde se disponen alrededor de un núcleo ovalado. (De Luna, 2012)

La situación de los osteocitos es teóricamente ideal para detectar el estrés mecánico y las microlesiones de la matriz. Estas células podrían transmitir señales a las células de revestimiento que utilizarían la información recibida para modular localmente el remodelado (Aubin 1995 y 1993).

1.1.1.3. Osteoclastos

Los osteoclastos son células óseas muy voluminosas, de forma generalmente redondeada. Se caracterizan morfológicamente por tener la particularidad de poseer varios núcleos, y por presentar en su citoplasma abundantes organelas, mitocondrias, lisosomas, vesículas y numerosas microvellosidades. Los osteoclastos proceden de las células madres hematopoyéticas extraesqueléticas, y se encuentran en la superficie del hueso que va a sufrir la resorción. Para poder reabsorber la matriz, los osteoclastos se unen a la superficie ósea acidificando el medio al secretar enzimas y protones, rompiéndole así, los enlaces entre los cristales de hidroxapatita y el colágeno (Khan 2001; Peck y Woods,1998).

1.2. Etanol y Salud Ósea

El alcohol se consume ampliamente en todo el mundo. Se consume tanto en entornos sociales como en culturales. Hasta hace poco tiempo, se reconocieron dos tipos de consumo de alcohol: el consumo crónico de alcohol o el consumo ocasional. Hoy en día, hay un nuevo patrón de consumo entre los adolescentes y los adultos jóvenes: consumo excesivo de alcohol. El consumo excesivo de alcohol es perjudicial para muchos órganos y tejidos, incluyendo los huesos, y se sabe que inducen osteoporosis secundaria. Algunos estudios, sin embargo, han informado de los beneficios provenientes del consumo ocasional de alcohol sobre parámetros

óseos. Hasta la fecha, poco se sabe sobre los efectos del consumo excesivo de alcohol en la salud ósea. (Maurel 2012)

Los datos de los diferentes estudios varían según el sexo y la edad de la población sometida a estudio. Para comprobar si el consumo de alcohol es perjudicial tras finalizar con la lactancia (periodo en el que se manifiesta una pérdida significativa de hueso) se añadió etanol a la alimentación de un grupo de ratas por diferentes periodos de tiempo, y los resultados fueron que el consumo de EtOH en el período inmediato al posdestete puede afectar significativamente la salud del esqueleto de la madre y provocar osteopenia a largo plazo (Shankar 2008). Antes de esta etapa, durante el embarazo, también se ha estudiado el efecto del etanol. Ratas embarazadas mostraron una pérdida ósea menor que las ratas no embarazadas. La pérdida ósea inducida por etanol en las ratas hembras no gestantes se debe principalmente a la activación de los osteoclastos, asociado con la disminución de los niveles circulantes de estradiol pero existen efectos negativos en ambos grupos de estudio. (Shankar 2006).

En definitiva, el abuso de alcohol disminuye la formación de hueso y deteriora la función de los osteoblastos para desequilibrar la remodelación ósea, conduciendo a una pérdida neta de hueso. (Chen 2011) (Vignesh 2006).

Otro estudio, también llevado a cabo con ratas, comparó el efecto óseo del alcohol en ratas que realizaban actividad física frente a ratas que no eran entrenadas en una rueda de ardilla (40min/día, 5días/semana). En los resultados se observaron alteraciones en la remodelación ósea y la composición corporal con el alcohol, al final del protocolo, que no apareció cuando el alcohol se combina con el ejercicio. (Maurel 2011). Por lo tanto existen factores externos que protegen de los efectos adversos del etanol.

En un estudio transversal realizado a 1697 mujeres sanas, se les entrevistó sobre sus hábitos de consumo, entre ellos la cerveza. Los resultados mostraron mayor densidad ósea en las mujeres bebedores de cerveza. Esto puede ser debido al contenido de fitoestrógenos de esta bebida alcohólica. (Pedrera-Zamorano 2009).

El consumo moderado de alcohol puede ser beneficioso para los huesos en hombres y mujeres posmenopáusicas. Sin embargo, en los hombres, el consumo elevado de bebidas alcohólicas (>2 bebidas/día) se asoció con un número significativamente menor DMO. La tendencia hacia las asociaciones más fuertes entre la DMO y la cerveza o el vino, en relación con el licor, sugiere que los componentes distintos del etanol pueden contribuir a la salud de los huesos. El silicio parece mediar en la asociación de la cerveza, pero no el de vino o licor, con la DMO. Otros

componentes necesitan una mayor investigación (Tucker 2009) (Pedrera-Zamorano 2009).

La asociación entre el consumo de alcohol y la salud ósea merece una mayor exploración. Depende de la cantidad de bebida alcohólica ingerida y del tipo de bebida. Si los componentes no alcohólicos explican las asociaciones positivas entre la salud y el consumo de alcohol los huesos, se puede argumentar que se puede obtener de otras fuentes además de las bebidas alcohólicas. (Macdonald 2009).

1.3. Isoflavonas y Salud Ósea

Las isoflavonas son componentes biológicos naturales existentes en las plantas. Estas sustancias son, muchas veces, poco tenidas en cuenta a la hora de armar un plan de alimentación. Las isoflavonas son parte de una subclase de un grupo mayor de fitoquímicos, llamados flavonoides. Estas sustancias naturales, son consideradas por su estructura como fitoestrógenos; nombre genérico para definir a dichas clases de compuestos que son no esteroides, difenólicos, que poseen una estructura química similar a la que presentan los estrógenos humanos. (Solari 2004)

Los flavonoides son específicos de las plantas y abundan en la acerola, el brócoli, la cereza, la endivia, la naranja, el puerro, el rábano, la remolacha, la uva, el té verde y negro, en el vino tinto y la cerveza, y en la soja y todos los alimentos derivados de ésta.

Debido a su capacidad de imitar las acciones de los estrógenos de mamíferos, los fitoestrógenos procedentes de la soja se han propuesto como agentes terapéuticos potenciales para ayudar en la prevención de la pérdida de hueso postmenopáusica. (Poulsen 2008).

Los hombres experimentan pérdida ósea progresiva con el envejecimiento, lo que provoca huesos frágiles. Se estima que uno de cada cinco hombres sufrirán una fractura osteoporótica durante su vida. El pronóstico para los hombres después de una fractura de cadera es muy sombrío. Algunos de los tratamientos disponibles incluyen las isoflavonas. (Banu 2013).

Estos tratamientos también son aplicables a mujeres. Las isoflavonas son una alternativa a la terapia hormonal para el alivio de los síntomas menopáusicos. Las dietas ricas en isoflavonas podrían ayudar a mantener el pico de masa ósea en las mujeres premenopáusicas. El efecto de las isoflavonas en mujeres perimenopáusicas no está suficientemente estudiado pero parece atenuar la pérdida ósea en la transición a la menopausia. En la posmenopausia, las

isoflavonas pueden presentar un beneficio modesto, pero su relevancia clínica en la prevención de fracturas osteoporóticas está por determinar. Castelo-Branco (2013).

La suplementación adicional con isoflavonas de soja parece mejorar la calidad de vida y la masa ósea en mujeres postmenopáusicas españolas. (García-Martín 2012). Sin embargo se necesitan estudios adicionales para afirmar con rotundidad el efecto antiosteoporótico del extracto de soja, aunque se ha demostrado su influencia al atenuar eficazmente la apoptosis de los osteoblastos. (Choi 2003).

Una revisión que incluye 36 estudios, también saca las mismas conclusiones: efecto beneficioso de las isoflavonas. En los estudios in vitro y en animales, las isoflavonas parecen estimular la formación ósea osteoblástica e inhibir la resorción ósea osteoclástica. Estos datos muestran la evidencia de un efecto beneficioso de las isoflavonas en la salud ósea en mujeres peri y posmenopáusicas cuando las isoflavonas de soja se incorporan en la dieta. (Castelo-Branco, 2011).

Sin embargo hay estudios que afirman lo contrario. La deficiencia de estrógenos después de la menopausia desemboca en la pérdida rápida de hueso, lo que predispone a las mujeres a las fracturas osteoporóticas. La genisteína, un fitoestrógeno presente en altas concentraciones en la soja, es un ingrediente en suplementos dietéticos comercializados agresivamente para la salud ósea. Sin embargo, en un ensayo clínico reciente de larga duración realizado con ratas, extrae que la eficacia de la soja en la reducción de la pérdida de hueso para mujeres postmenopáusicas es decepcionante. (Turner 2013).

La alimentación es uno de los pilares en la investigación de la salud ósea, no solo utilizando isoflavonas en los estudios, sino también otros componentes como las proteínas, la cafeína y la vit D. Tras la ingesta de esta última se observó una mayor amplitud de sonido en la ecografía ósea cuantitativa realizada a las mujeres del estudio, mostrando así un beneficio significativo. (Rico 2002).

1.3.1 Tipos de isoflavonas

1.3.1.1. Genisteína

La genisteína, la más estudiada de los tres tipos, es una isoflavona abundante en la soja y sus derivados. Se ha comprobado que esta isoflavona mejora los parámetros de neoformación ósea y reduce los indicadores de resorción. La mejoría

en el recambio se puede objetivizar al medir la densidad mineral ósea de la cabeza del fémur y la columna vertebral. El mecanismo de acción no es del todo conocido.

La osteoprotegerina, se secreta por los osteoblastos y es de la familia de los receptores de los factores de necrosis tumoral. Se liga al sistema de ligandos nucleares kB, neutralizándolo y regula negativamente la diferenciación de osteoclastos y su actividad. La genisteína y los estrógenos estimulan la expresión de la osteoprotegerina, explicando parte de su acción beneficiosa sobre el hueso. Por lo tanto, la genisteína altera el balance del sistema osteoprotegerina / sistema de ligandos nucleares kB positivamente y mejora el recambio óseo. (Solari 2004).

Otras de las cualidades estudiadas de esta isoflavona es que puede proteger a los osteoblastos de la hipoxia y aumentar la diferenciación osteogénica significativamente. (Han 2012).

La administración oral de estos factores ha sido demostrada para prevenir la pérdida de hueso en ratas ovariectomizadas, un modelo animal para la osteoporosis, que indica un papel en la prevención de la osteoporosis. El consumo suplementario de ingredientes con la combinación de zinc y genisteína se ha demostrado que tienen un efecto preventivo sobre la osteoporosis en sujetos humanos, lo que sugiere un papel en la prevención de la pérdida de hueso. (Yamaguchi 2012).

1.3.1.2. Daidzeína

Existen pocos estudios que investiguen de forma individual las propiedades de la daidzeína. En la mayoría de los casos la encontramos asociada a la genisteína, obteniendo resultados globales de ambas, y no por separado.

En un estudio realizado durante 2 años con 431 mujeres posmenopáusicas de entre 45 y 65 años, el consumo de isoflavonas (genisteína + daidzeína) no pudo evitar un descenso de la DMO con respecto al grupo placebo, por lo que los efectos no serían relevantes. (Tai 2012)

Sin embargo, la mayoría de los resultados encontrados contradicen este caso. Bhargavan, con los resultados de su estudio de 2012, recomienda incluir genisteína y daidzeína en la dieta durante la deficiencia de estrógeno por tener efectos favorables y de conservación en el hueso. (Bhargavan 2012)

También se ha probado el efecto de derivados de la daidzeína. Se sintetizaron y se evaluó su eficacia para la estimulación de la diferenciación de los osteoblastos utilizando cultivos primarios de bóveda craneal de rata. En conjunto, se

demuestra la actividad osteogénica de análogos de la daidzeína en concentraciones significativamente más bajas que la daidzeína. (Yadav 2011).

1.3.1.3. Formononetina

Se ha estudiado poco sobre las capacidades de este tipo de isoflavona, ya que la mayoría de la bibliografía se centra en las dos anteriores. Sin embargo, un estudio realizado en 2011 (Huh 2011), afirma que la formononetina promueve la reparación endotelial y la cicatrización de heridas y que se utiliza como un potenciador de la sangre y para mejorar la microcirculación sanguínea en la medicina complementaria y alternativa.

1.4. Cultivo Celular MG-63

Línea de células de osteosarcoma MG-63 humana es ampliamente utilizada para investigar los osteoblastos humanos debido a sus propiedades similares.

Una revisión que compara la utilización de diferentes líneas celulares muestra que, para algunas áreas de la investigación de la medicina, como por ejemplo, al buscar agentes terapéuticos para condiciones patológicas que se producen en un momento determinado de vida (por ejemplo, osteoporosis) o ciertos mecanismos moleculares involucrados en ese estado, estudiar las células derivadas de los donantes con enfermedad diagnosticada son beneficiosos. Además, el uso de células de osteoblastos humanos da resultados más relevantes y trae el beneficio clínico en el proceso de traslación. (Czekanska 2012).

Esta afirmación es contrastada al existir multitud de artículos que elige la línea celular MG-63 para investigar con células que se comportan como osteoblastos, como por ejemplo en Starý 2013, Moran 2012, Vorndran 2011 y Abe 2000.

1.5. Isoflavonas, etanol y cultivos celulares

Existe escasa bibliografía que relacione las isoflavonas y el etanol con el efecto que producen en los cultivos celulares óseos.

Uno de los encontrados consiguió demostrar que el extracto de etanol de la planta *Wedelia calendulacea* Less., una hierba perenne que contiene isoflavonoides, tiene un efecto protector. Esto fue apoyado además por los estudios histopatológicos. Investigaciones revelaron la presencia de isoflavonas, que son conocidas por actuar como fitoestrógenos y pueden ser responsables de la actividad antiosteoporótica. (Annie 2006).

Otro tipo de investigaciones, estudian las isoflavonas y el etanol pero con otro tipo de cultivos celulares, no necesariamente óseos.

La cantidad de daidzeína en soja fermentada aumenta 44 veces más en comparación con la soja sin fermentar. Se ha demostrado que el etanol de extractos de soja promueve la supervivencia de las células del bazo del ratón y del timo en la cultura mediante la supresión de su muerte por apoptosis. (Kim 2007).

2.- OBJETIVOS

Los objetivos planteados para este estudio son comprobar las siguientes hipótesis:

- Confirmar el efecto tóxico del etanol sobre la viabilidad y proliferación de las células de osteoblastos (MG-63).
- Estudiar el posible papel protector de diferentes isoflavonas frente al efecto tóxico del etanol en las células óseas.

3.- METODOLOGÍA.

3.1. Línea celular de osteoblastos humanos.

Para este estudio, se utilizó la línea celular MG63. Es una línea tipificada de osteoblastos, que se obtuvo a partir de tejido óseo humano procedente de un varón caucásico de 14 años de edad con un osteosarcoma (ATCC: CRL-1427); la cual, fue proporcionada por la American Type Culture Collection (ATCC), a través del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. La Universidad de Granada facilitó una muestra de estas células al grupo GIEMO de la Universidad de Extremadura. Ésta es comúnmente utilizada como modelo de osteoblasto en diferentes estudios de esta población celular. (De Luna, 2012)

La línea celular MG63 se cultivó en frascos de 25 cm² de superficie (Falcom, Labware, Oxford, UK) con 10 ml de medio DMEM (Gibco, Cell Culture Products, Carlsbad, CA) suplementado con: L-Glutamina al 1% (Sigma Chem. Comp., St. Louis, Mo, USA), HEPES al 2% (Sigma Chem. Comp., St. Louis, Mo, USA), 2,5 µg/ml de Anfotericina B (Sigma Chem. Comp., St. Louis, Mo, USA), 100 UI/ml de Penicilina (laboratorios ERN S.A., Barcelona, Spain), 100 µg/ml de Estreptomina. (Braun Medical S.A. Jaén, España) y suero bovino fetal (SBF) al 10% (Gibco, Paisley, UK), previamente descomplementado en un baño a 56°C durante 30 minutos. Las células se cultivaron en este medio a 37°C, en una atmósfera de CO₂ al 5% hasta conseguir un crecimiento semiconfluyente. (De Luna, 2012).

Esta línea celular, crece adherida a la superficie del frasco de cultivo, por lo que para su utilización o subcultivo es preciso despegarlas de dicho frasco; para ello se utilizó 10 ml de una solución de Tripsina-EDTA (Sigma -Aldrich Co. Chem. Comp., St. Louis, Mo, USA), durante 10 min a 37°C. Transcurrido este tiempo la actividad enzimática se neutralizó con 20 ml de medio DMEM suplementado al 10% con SBF. La suspensión celular obtenida se centrifugó a 1600 rpm durante 11 minutos a 17°C. El sedimento obtenido se suspendió en medio de cultivo para su posterior uso. (De Luna, 2012)

en la anterior y finalmente para la formononetina 0.1 μM , 0,5 μM , 1 μM , 10 μM , 50 μM , 100 μM , 200 μM y 500 μM .

Los tres cultivos finales consistían en la adición de la concentración elegida (por su significancia estadística y en comparación a estudios similares) de los diferentes tipos de isoflavonas (Genisteína 10 μM , Daidzeína 1 μM y Formononetina 100 μM) a la concentración de 1% de etanol (elegida también por los resultados estadísticos y la bibliografía). Estos cultivos se mantenían en incubación durante 24h a 37°C, 95% de humedad y 5%CO₂.

Se añadieron 100 μl por pocillo 5 mg/ml de MTT, incubándose durante cuatro horas a 37°C en estufa de CO₂ al 5%. Transcurrido ese tiempo, se retiró el sobrenadante y se añadieron 100 μl por pocillo de Dimetilsulfóxido (DMSO), para disolver los cristales de formazán. Se dejó actuar durante 30 minutos y finalmente se midió por espectrofotometría, a una longitud de onda de 570 nm (Modelo RT-6100, Rayto Life and Analytical Sciences Co.,Ltd. China).

De cada una de las situaciones se realizaban 4 experimentos con tres muestras de cada uno. Para obtener un valor lo más real posible se hallaba la media de todos ellos con la desviación típica correspondiente.

La recogida y análisis de datos se ha llevado a cabo con el programa SPSS en su versión 19 utilizando diferentes pruebas estadísticas para la obtención de resultados.

Para la comparación entre categorías hemos utilizado la prueba de Kruskal-Wallis, un método no paramétrico. Es equivalente al ANOVA, pero a diferencia de ésta, al ser no paramétrico, no asume normalidad en los datos.

Para hacer comparaciones múltiples de las medias de los grupos hemos utilizado la prueba de Scheffé. Su uso está relacionado con la prueba del análisis de la varianza, y se incluye dentro de las pruebas de comparación múltiple.

Se considera significancia estadística cuando $p < 0.05$

4.-RESULTADOS / DESARROLLO.

4.1. Curvas dosis/respuesta de etanol sobre la viabilidad de los cultivos de células MG-63

En la primera placa, se comprobó el efecto nocivo del etanol sobre la viabilidad del cultivo celular MG63 en 24h. En la figura 1 se observan los diferentes porcentajes de etanol a las que fueron sometidas las células de osteoblastos.

Tomando el 100% de viabilidad en la muestra control (sin añadir ningún tipo de agonista) procedemos a valorar los resultados en los diferentes porcentajes de etanol utilizados.

Con etanol al 0,01% y al 0.05% se obtiene una viabilidad del $91.29\% \pm 18.97$ y $80,59\% \pm 10.87$ respectivamente, pero dichas concentraciones de etanol no son estadísticamente significativas ($p > 0.05$).

Con el resto de concentraciones si obtenemos resultados estadísticamente significativos ($P < 0.001$). Al 0.1% de etanol obtenemos una viabilidad del $66.32\% (\pm 9.64)$. Con etanol al 0.5%, se produce una muerte del 45.59% de las células ± 10.87 . Al 1% de etanol, dato que cogeremos de referencia para los siguientes cultivos con isoflavonas, obtenemos una viabilidad del $67.71\% \pm 16.84$. Por último en las concentraciones al 2, 4 y 5% la muerte se produce en un $54.79\% \pm 12.57$, $62.65\% \pm 9.34$ y $69.76\% \pm 7.79$ respectivamente.

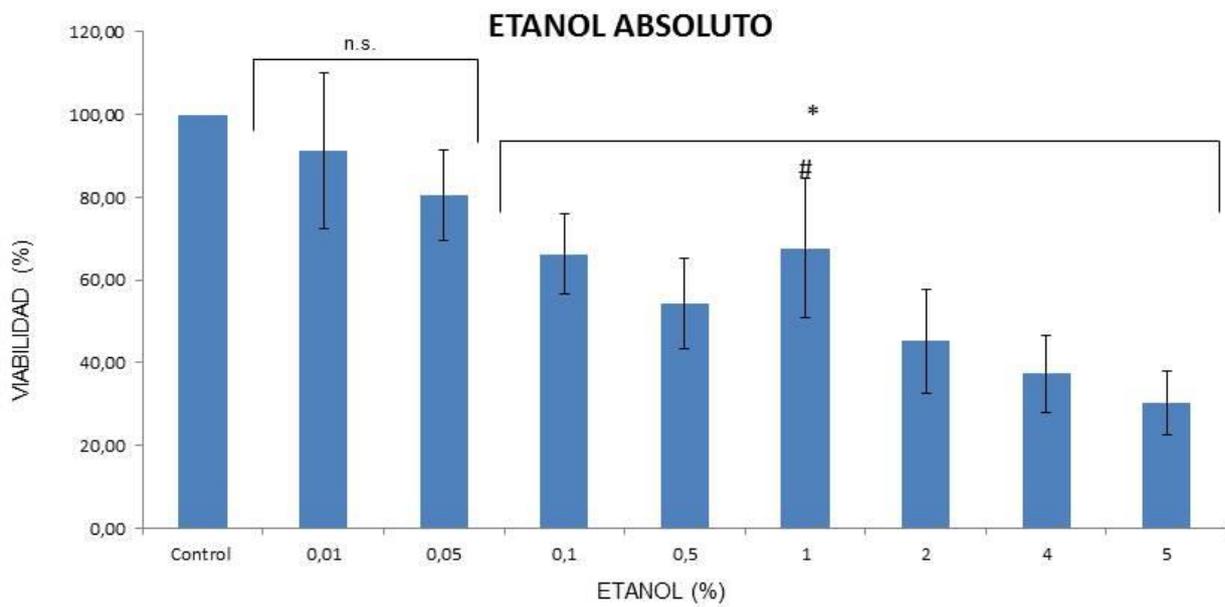


Figura 1. Viabilidad de cultivo de células MG63 a diferentes % de etanol.

n.s. → $p > 0,05$

* → $p < 0,01$ vs control

Se toma como valor para las siguientes pruebas de viabilidad el etanol al 1%.

4.2. Curvas dosis/respuesta de diferentes isoflavonas sobre la viabilidad de células MG-63

Otro de los experimentos realizados era observar el efecto que tienen las isoflavonas por si solas sobre el cultivo de células osteoblásticas en 24h. Para ello hemos utilizado tres tipos diferentes de isoflavonas, y tras los resultados hemos tomado una de las concentraciones de cada una de ellas para el posterior estudio en conjunto con el etanol.

4.2.1. Curva dosis/respuesta de la Genisteína sobre la viabilidad de células MG-63

En la placa de estudio de la genisteína, contábamos con un control con células MG63 y diferentes concentraciones μM de genisteína. (Figura 2)

Con genisteína $0.1\mu\text{M}$, $1\mu\text{M}$ y $5\mu\text{M}$ la viabilidad de las células era superior a la del control, con un $105.24\%\pm 14.22$, $104.27\%\pm 16.99$ y $102.87\%\pm 19.06$ respectivamente.

En los cultivos con genisteína $0.5\mu\text{M}$, $2\mu\text{M}$ los resultados fueron similares pero inferiores al control, obteniendo una viabilidad de $98.86\%\pm 16.19$ y $97.11\%\pm 16.22$ respectivamente.

El dato de concentración de genisteína elegido para los siguientes experimentos con la misma fue el de $10\mu\text{M}$ con una viabilidad de $95.76\%\pm 24.93$. Esta elección es debida a que en la bibliografía consultada, es el dato más utilizado y por lo tanto el más estudiado para este tipo de estudios.

En las últimas concentraciones de genisteína $20\mu\text{M}$ y $40\mu\text{M}$ se obtiene una muerte del $17.06\%\pm 22.69$ y $23.06\%\pm 12.61$ respectivamente

La ultima concentración ($40\mu\text{M}$) es el único resultado estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

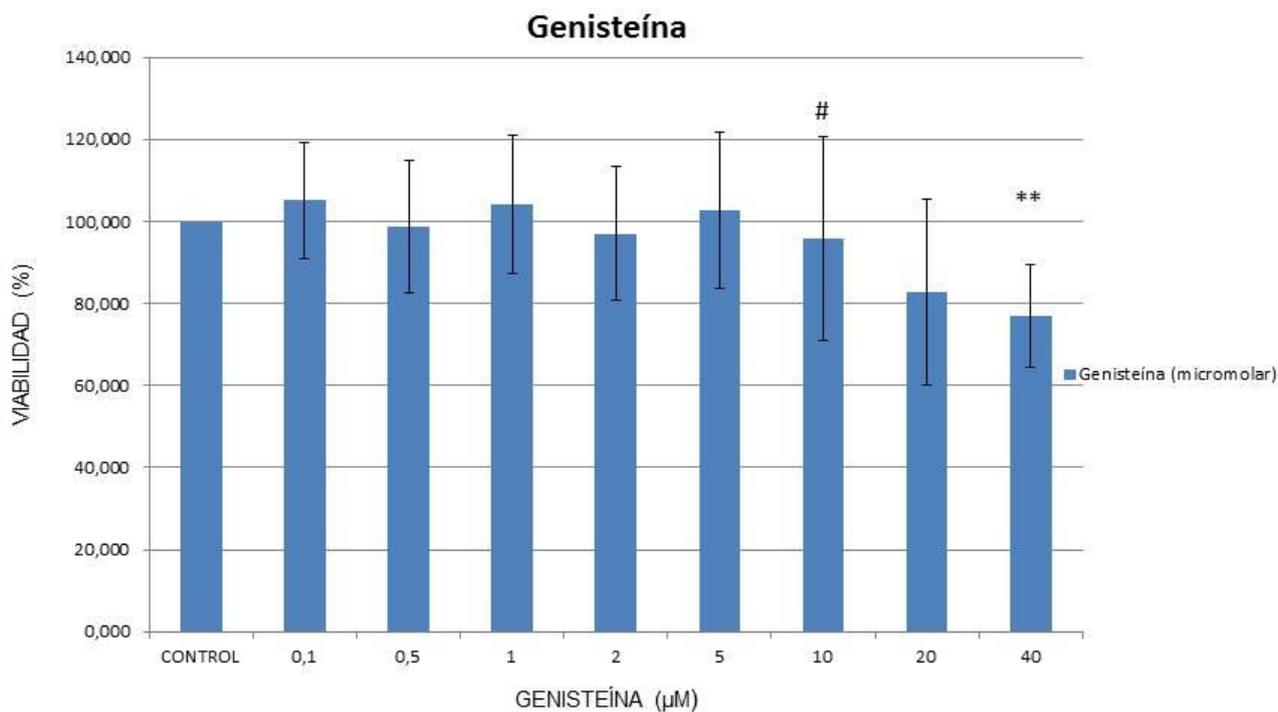


Figura 2. Viabilidad de cultivo de células MG63 a diferentes concentraciones de genisteína.

El dato de concentración de genisteína elegido para los siguientes experimentos fue el de 10µM.

** $p < 0,03$

4.2.2. Curva dosis/respuesta de la Daidzeína sobre la viabilidad de células MG-63.

Para el estudio de la daidzeína se han utilizado las mismas concentraciones que con la genisteína. (Figura 3)

El valor que tomamos de referencia en este caso es la concentración 1µM con una viabilidad de $110.322\% \pm 24.67$ y una $p=0.99$, como en el caso anterior, este es el dato más usado en estudios similares.

Con concentraciones de 5µM, 10µM y 20µM y viabilidad del $93.12\% (\pm 27.84)$, $84.81\% \pm 32.81$ y $79.75\% \pm 26.59$ si obtenemos resultados estadísticamente significativos con una $p < 0.05$.

Con la menor concentración, $0.1\mu\text{M}$, y con la mayor, $40\mu\text{M}$, obtenemos los resultados más altos de viabilidad, con un porcentaje de $106.84\%\pm 22.99$ y $106.86\%\pm 38.92$ respectivamente.

En el resto de los casos, $0.5\mu\text{M}$, y $2\mu\text{M}$, el resultado de la viabilidad es de $104.85\%\pm 22.55$ y de $114.74\%\pm 23.14$.

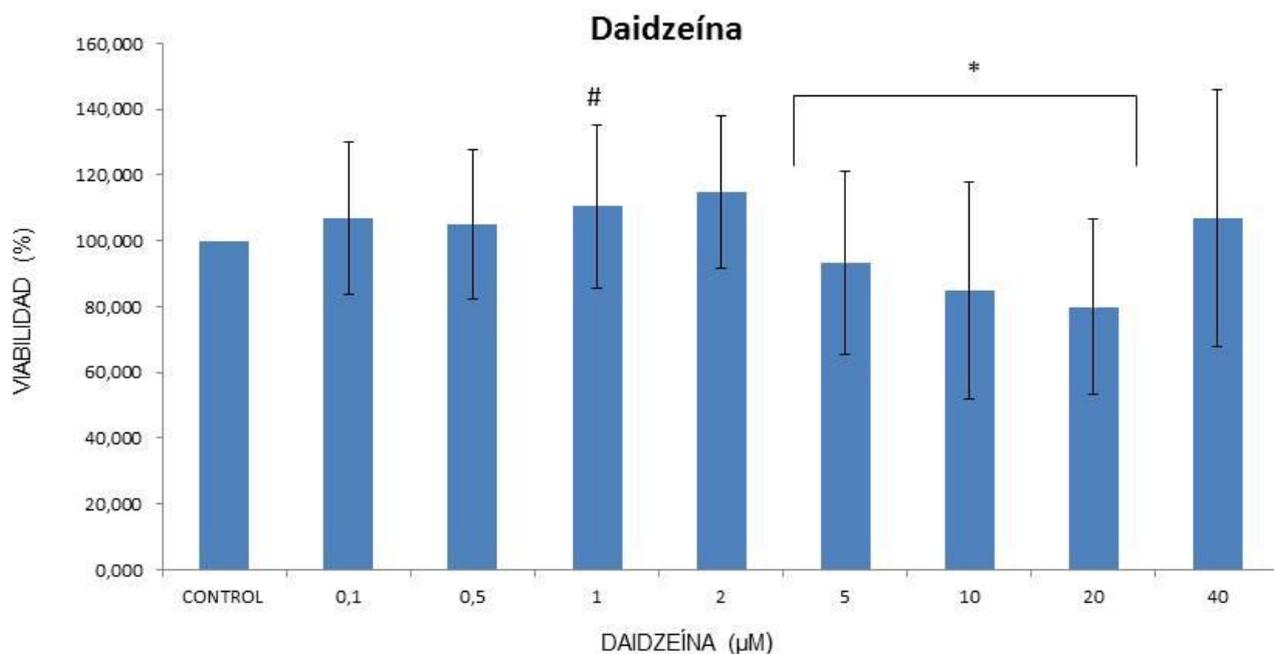


Figura 3. Viabilidad de cultivo de células MG63 a diferentes concentraciones de daidzeína.

El valor que tomamos de referencia en este caso es la concentración $1\mu\text{M}$.

* \rightarrow Con concentraciones de $5\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$ y $20\mu\text{M}$, obtenemos resultados estadísticamente significativos con una $p < 0.05$.

4.2.3. Curva dosis/respuesta de la Formononetina sobre la viabilidad de células MG-63

Las concentraciones utilizadas con la formononetina son diferentes a las empleadas con la genisteína y la daidzeína por tener una mayor tolerancia a dosis elevadas. (Figura 4)

Con concentraciones de 0.1 μ M, 0.5 μ M, 1 μ M, 10 μ M y 50 μ M el porcentaje de muerte celular es de un 8.19 \pm 15.33, 5.01 \pm 16.64, 5.02 \pm 16.68, 6.42 \pm 14.72 y 4.30 \pm 24.77 respectivamente.

La concentración de la formononetina usada en este caso para el estudio final es de 100 μ M debido a la bibliografía consultada, con una viabilidad de 103.46 \pm 23.79.

Por último, con las concentraciones de 200 y 500 μ M la viabilidad resultante es de 102.24 \pm 22.94 y 110.03 \pm 22.95.

En ninguno de los casos se ha obtenido una $p < 0.05$.

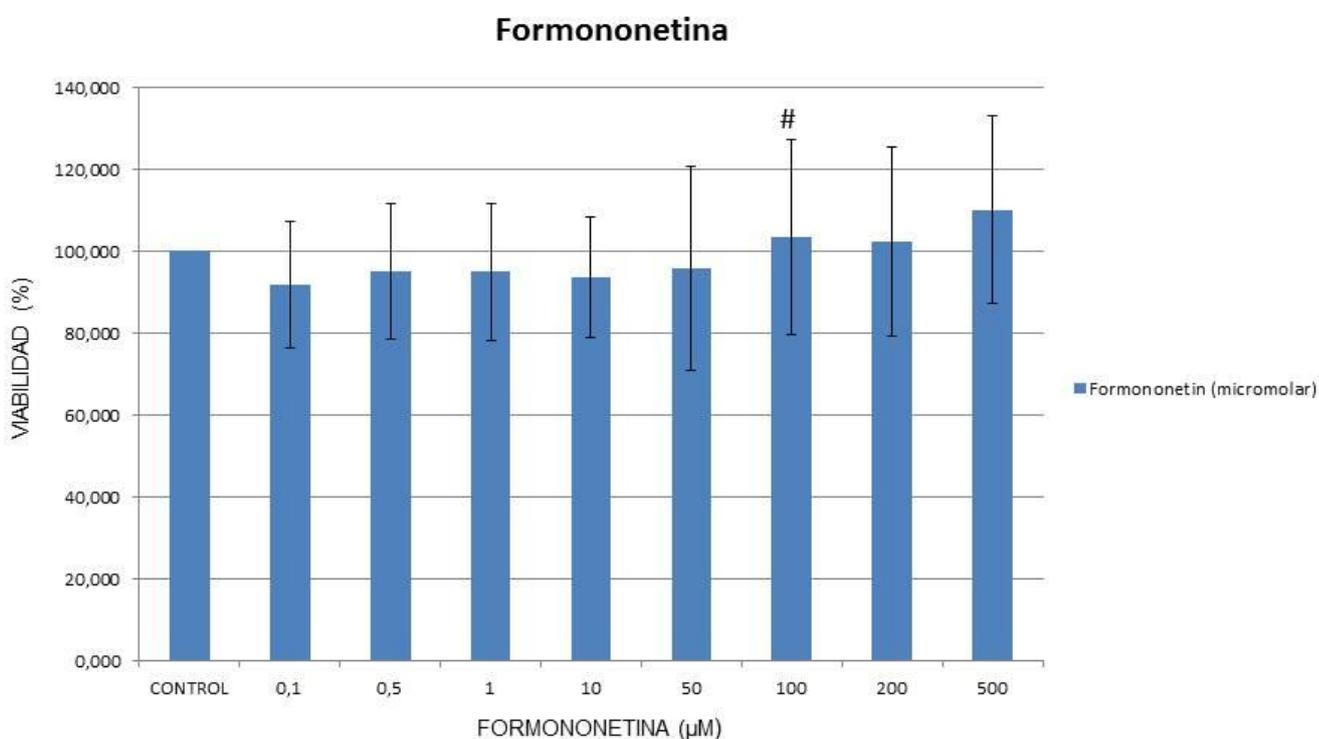


Figura 4. Viabilidad de cultivo de células MG63 a diferentes concentraciones de formononetina.

*La concentración de la formononetina usada en este caso para el estudio final es de 100 μ M.

En ninguno de los casos se ha obtenido una $p < 0.05$.

4.3. Estudio del posible efecto protector de diferentes isoflavonas sobre la muerte celular inducida por etanol en células MG-63

Los tres cultivos finales consistían en la adición de la concentración elegida de los diferentes tipos de isoflavonas (Genisteína 10 μM , Daidzeína 1 μM y Formononetina 100 μM) a la concentración de 1% de etanol.

En el primer caso Genisteína 10 μM + etanol 1% se obtuvo una viabilidad del 83.62% \pm 22.93 con una $p=0.057$

En el segundo caso Daidzeína 1 μM + etanol 1% se obtuvo una viabilidad del 81.98% \pm 19.75 con una $p<0.05$

En el tercer caso Formononetina 100 μM + etanol 1% se obtuvo una viabilidad del 84.46% \pm 24.28 con una $p=0.08$.

En todos los casos combinados, la viabilidad es menor a la existente con la actuación cualquiera de las isoflavonas de manera solitaria, pero mayor a la resultante tras la actuación del etanol al 1%.

En la figura 5 podemos observar la actuación de los diferentes agonistas por separado en comparación con la combinación del etanol con las isoflavonas, respecto al control, al que le damos una viabilidad del 100%.

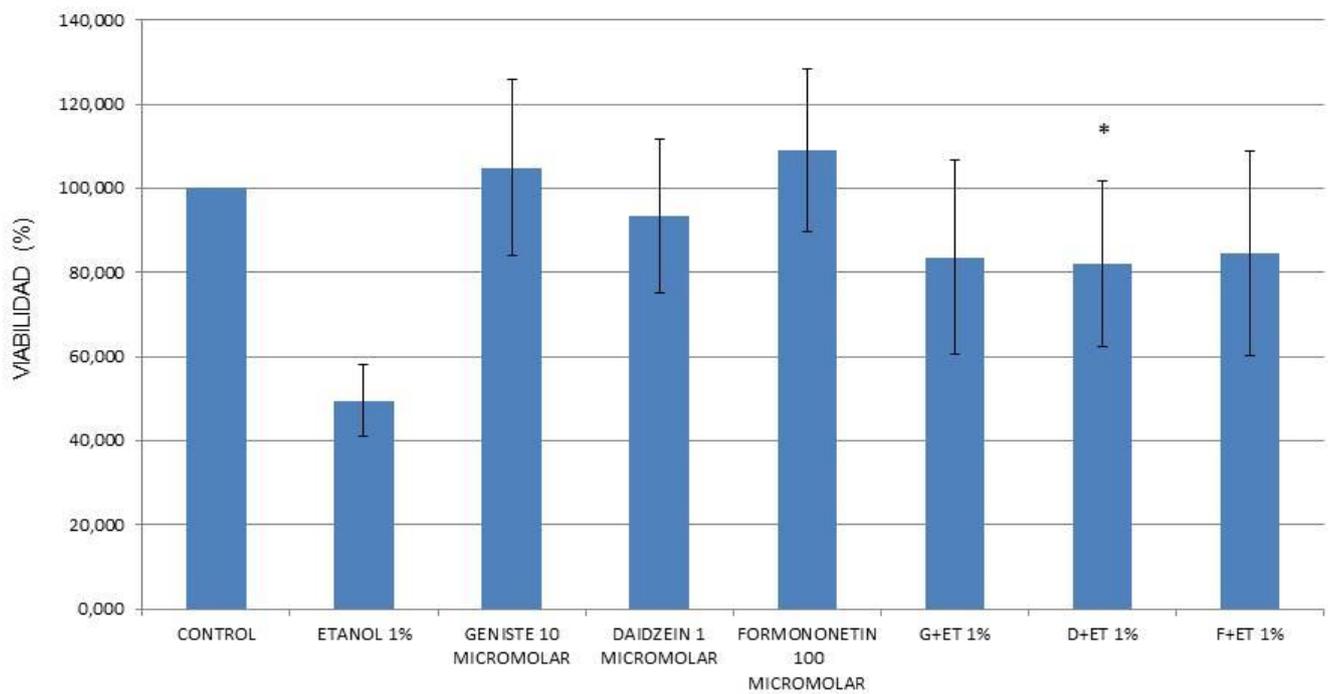


Figura 5. Viabilidad de los diferentes agonistas por separado y en combinación etanol + isoflavonas.

En todos los casos combinados, la viabilidad es menor a la existente con la actuación cualquiera de las isoflavonas de manera solitaria, pero mayor a la resultante tras la actuación del etanol al 1%, a excepción de la combinación con Daidzeína, cuya $p < 0,05$.

5.- DISCUSIÓN

El estudio del etanol y de su efecto en la salud ha sido ampliamente estudiado con diferentes variables. Principalmente existen estudios de bebidas alcohólicas concretas, por lo que los resultados sobre el efecto del etanol absoluto queda enmascarado por los diferentes componentes de las bebidas. (Tucker 2009).

Para poder obtener la mayor significancia y fiabilidad posible, se han realizado experimentos in vitro de los dos agonistas sometidos a estudio por separado (etanol y diferentes tipos de isoflavonas) y posteriormente se han combinado.

El consumo excesivo de alcohol es perjudicial para muchos órganos y tejidos, incluyendo los huesos, y se sabe que inducen osteoporosis secundaria. (Maurel 2012)

En el presente estudio, hemos demostrado que el efecto de etanol absoluto disminuye la viabilidad celular, por lo tanto aumenta la muerte celular y puede ser un factor de riesgo para futuras enfermedades óseas.

Otros autores han obtenido resultados similares con estudios in vivo con ratas. Este efecto ha sido atribuido a una disminución en la formación de hueso. Dichos resultados se han obtenido con la medición de la DMO. (Maurel 2011) (Shankar 2008).

Las isoflavonas, debido a su capacidad de imitar las acciones de los estrógenos de mamíferos, se han propuesto como agentes terapéuticos potenciales para ayudar en la prevención de la pérdida de hueso postmenopáusica. (Poulsen 2008).

En el presente estudio hemos demostrado que dos de los tipos de isoflavonas estudiadas (Genisteína y Formononetina) aumentan la viabilidad celular, produciendo efectos beneficiosos en los cultivos celulares MG63, pudiendo ser un factor importante a tener en cuenta para disminuir los riesgos de enfermedades óseas. Sin embargo con la Daidzeína hemos obtenido valores estadísticamente significativos inferiores al control.

Con la genisteína, la tendencia de la gráfica parece prever que a partir de cierta concentración, la viabilidad con respecto al aumento del agonista es inversamente proporcional, y que los efectos comenzarían a ser nocivos.

Los mejores resultados son los obtenidos con la Formononetina, parece ser que este tipo de isoflavona es la más efectiva en el aumento de la viabilidad de los osteoclastos estudiados.

En otros estudios in vitro e in vivo que utilizan las isoflavonas como agonistas han demostrado que las dietas ricas en isoflavonas podrían ayudar a mantener el pico de masa ósea en las mujeres premenopáusicas. Castelo-Branco (2013).

Sin embargo otro estudio in vivo de isoflavonas (genisteína), obtiene como resultado que no se aprecian beneficios en su administración para evitar la pérdida ósea. (Turner 2013)

El efecto que tiene la unión de estos dos agonistas no está muy estudiado en lo que a su efecto óseo se refiere. Si hay bibliografía sobre el efecto beneficioso de bebidas alcohólicas como la cerveza o el vino, que contienen ambos elementos, pero no lo analizan y desglosan de forma detallada, y además introducen otros componentes como por ejemplo el silicio. (Tucker 2009) (Pedrera-Zamorano 2009).

En nuestro estudio hemos demostrado que la asociación de las isoflavonas a los cultivos celulares con etanol, producen un efecto beneficioso al aumentar la viabilidad celular con respecto a los datos de viabilidad obtenidos con etanol absoluto y el control. No sabemos con certeza si este efecto positivo es producido porque las isoflavonas desempeñan un papel protector frente al etanol o debido a la multiplicación de las células vivas restantes que podrían enmascarar dicho resultado.

Existen publicaciones que relacionan el efecto del etanol y las isoflavonas pero solo una relacionada con la repercusión en las células óseas. Los resultados muestran que el extracto de etanol de la planta *Wedelia calendulacea*, que cuenta también con la presencia de isoflavonas, pueden ser responsables de la actividad antiosteoporótica, por lo tanto, serían beneficiosas para la salud ósea. (Annie 2006).

Como limitaciones de nuestro estudio contamos con que sólo tenemos resultados de experimentos cultivados en 24h. No se ha analizado el proceso de muerte celular y en el caso del aumento celular al añadir isoflavonas a un cultivo celular con etanol, no podemos demostrar si es debido a un papel protector de las isoflavonas frente al etanol o a un mayor crecimiento celular de las células vivas restantes por actuación de las isoflavonas. Por último hemos utilizado la técnica de MTT descrita con anterioridad para medir la viabilidad celular, pudiendo ser interesante contrastar los resultados con otras técnicas con finalidad similar.

Uno de los mayores puntos fuertes de este estudio es el uso del cultivo celular MG63, ya que ha sido muy estudiado en este campo y tiene un comportamiento muy similar al esperado en su equivalencia in vivo al ser células óseas humanas.

6.- CONCLUSIONES

1. El etanol disminuye la viabilidad de los cultivos de osteoblastos. La adición de este agonista al cultivo celular produce un aumento de la muerte celular, existiendo una asociación entre la dosis de etanol añadida al cultivo y la muerte celular que se produce en el mismo.
2. La genisteína y sobre todo la formononetina, parecen tener un efecto protector sobre la toxicidad inducida por etanol, ya que aumenta la viabilidad de las células en comparación con el control, sin embargo, la daidzeína parece no tener dicho efecto protector.

7.- LÍNEAS FUTURAS

Como futura línea de investigación sobre este tema sería interesante realizar estudios similares aumentando los tiempos de incubación celular para observar si los resultados obtenidos son similares.

También podrían tenerse en cuenta concentraciones de isoflavonas y etanol, diferentes a las empleadas en el estudio actual.

La comprobación de los mecanismos moleculares que regulan tanto la toxicidad como la protección celular, daría una información adicional importante a la hora de interpretar los resultados.

8.- AGRADECIMIENTOS

A María de la Luz Canal Macías por la tutorización del trabajo.

Al grupo GIEMO, por la ayuda prestada para la utilización de sus dependencias y por facilitar el material con el que se ha podido llevar a cabo el presente estudio.

9.- BIBLIOGRAFÍA

ABE Y, KAWAKAMI A, NAKASHIMA T, EJIMA E, FUJIYAMA K, KIRIYAMA T, IDE A, SERA N, USA T, TOMINAGA T, ASHIZAWA K, YOKOYAMA N, EGUCHI K. (2000). Etidronate inhibits human osteoblast apoptosis by inhibition of proapoptotic factor(s) produced by activated T cells. *J Lab Clin Med.* Nov;136(5):344-54.

ANNIE S, PRABHU RG, MALINI S. (2006). Activity of *Wedelia calendulacea* Less. in post-menopausal osteoporosis. *Phytomedicine.* Jan;13(1-2):43-8.

AUBIN JE., LIU F., MALAVAL L. Y GUPTA AK. (1995). Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone* 17(2), 77s-83s.

AUBIN JE., TURKSEN K. Y HERSCHE JNM. (1993). Osteoblastic cell Lineage. En: Noda M, ed. *Cellular and Molecular Biology of Bone.* San Diego; Academic Press Inc; 1-45.

BANU J. (2013) Causes, consequences, and treatment of osteoporosis in men. *Drug Des Devel Ther.* Aug 22;7:849-60.

BHARGAVAN B , D SINGH , GAUTAM AK , MISHRA JS , KUMAR A , GOEL A , DIXIT M , PANDEY R , MANICKAVASAGAM L , DWIVEDI SD , CHAKRAVARTI B , JAIN GK , RAMACHANDRAN R , R MAURYA , TRIVEDI A , CHATTOPADHYAY N , SANYAL S . (2012). Medicarpin, a legume phytoalexin, stimulates osteoblast differentiation and promotes peak bone mass achievement in rats: evidence for estrogen receptor β -mediated osteogenic action of medicarpin. *J Nutr Biochem.* Jan; 23 (1):27-38

- BOIVIN G., ANTHOINE-TERRIER Y OBRANT KJ. (1990). Transmission electron microscopy of bone tissue. A review. *Acta Orthop Scand*, 61(2): 170-180.
- BONEWALD L. (2006). Osteocytes as multifunctional cells. *J Musculoskelet Neuronal Interact*; 6:331-333.
- BOSTROM MPG., YANG X. Y KOUTRAS I. (2000). Biologics in bone healing. *Curr Op Orthop*; 11:403-412.
- CARDOSO L., HERMAN BC., VERBORGT O., LAUDIER D., MAJESKA RJ. Y SCHAFFLER MB. (2009) Osteocyte apoptosis controls activation of intracortical resorption in response to bone fatigue. *J Bone Miner Res*; 24:597-605.
- CASTELO-BRANCO C, SOVERAL I. (2013). Phytoestrogens and bone health at different reproductive stages. *Gynecol Endocrinol*. Aug;29(8):735-43.
- CASTELO-BRANCO C, CANCELO HIDALGO MJ. (2011) Isoflavones: effects on bone health. *Climacteric*. Apr;14(2):204-11.
- CHEN JR, LAZARENKO OP, SHANKAR K, BLACKBURN ML, LUMPKIN CK, BADGER TM, RONIS MJ. (2011). Inhibition of NADPH oxidases prevents chronic ethanol-induced bone loss in female rats. *J Pharmacol Exp Ther*. Mar;336(3):734-42.
- CHOI EM , KOO SJ. (2003) Effects of soybean ethanol extract on the cell survival and oxidative stress in osteoblastic cells. *Phytother Res*. Jun;17(6):627-32.

CZEKANSKA EM, STODDART MJ, RICHARDS RG, HAYES JS. 2012. In search of an osteoblast cell model for in vitro research. *Eur Cell Mater.* Jul 9;24:1-17.

DE LUNA BERTOS, ME. (2012) Efecto de los antiinflamatorios no esteroideos sobre el osteoblasto: determinación del mecanismo de acción, Tesis doctoral, Universidad de Granada.

DUCY P. Y KARSENTY G. (1998). Genetic control of cell differentiation in the skeleton. *Curr Opin Cell Biol.*, 10, 614-619.

ERIKSEN EF. (2010). Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord*, 11:219-227.

FROST HM.(2001). Why should many skeletal scientists and clinicians learn the Utah paradigm of skeletal physiology? *Musculoskelet. Neuronal Interact.* 2 121-130.

GARCÍA-MARTÍN A, QUESADA CHARNECO M, ALVÁREZ GUIADO A, JIMÉNEZ MOLEÓN JJ, FONOLLÁ JOYA J, MUÑOZ-TORRES M. (2012). Effect of milk product with soy isoflavones on quality of life and bone metabolism in postmenopausal Spanish women: randomized trial. *Med Clin (Barc)*. Feb 4;138 (2):47-51.

HAN GQ, GE BF, CHEN KM, MA HP (2012). Study on mechanism of the antihypoxia effect of genistein on osteoblasts in vitro. *Zhong Yao Cai*. Jan;35(1):87-94.

- HUH JE, NAM DW, BAEK YH, KANG JW, PARQUE DS, CHOI DY, LEE JD. (2011) Formononetin accelerates wound repair by the regulation of early growth response factor-1 transcription factor through the phosphorylation of the ERK and p38 MAPK pathways. *Int. Immunopharmacol* Jan; 11 (1):46-54.
- KASSEN M., ABDALLAH BM., Y SAEED H. (2008). Osteoblastic cells: Differentiation and trans-differentiation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 473:183-187.
- KHAN K., MCKAY H., KANNUS P., BAILEY D., WARK J. Y BENNELL K. (2001). *Physical activity and bone health. (1ªed).* Champaign: Human Kinetics.
- KIM HB, LEE HS, KIM SJ, YOO HJ, HWANG JS, CHEN G, YOUN HJ. (2007). Ethanol extract of fermented soybean, Chungkookjang, inhibits the apoptosis of mouse spleen, and thymus cells. *J Microbiol.* Jun;45(3):256-61.
- KSIEZOPOLSKA-ORLOWSKA K. (2010) Change in bone mechanical strength in response to physical therapy. *Pol Arch Med Wewn;* 120 (9):368-373.
- LIAN JB., STEIN GS., CANALIS E., GEHRON ROBEY P. Y BOSKEY AL. (1999). Bone formation: osteoblast lineage cells, growth factors, matrix proteins, and the mineralization process. In Favus MJ. (4ªed.), *Primer on the Metabolic Bone Diseases of Mineral Metabolism.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- MACDONALD HM. (2009) Alcohol and recommendations for bone health: should we still exercise caution? *Am J Clin Nutr.* Apr;89(4):999-1000
- MANOLAGAS SC. (2000). Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.*, 21, 115-137.

MAUREL DB, BOISSEAU N, BENHAMOU CL, JAFFRE C. (2012) Alcohol and bone: review of dose effects and mechanisms. *Osteoporos Int.* 2012 Jan;23(1):1-16.

MAUREL DB, BOISSEAU N, INGRAND I, DOLLEANS E, BENHAMOU CL, JAFFRE C. (2011). Combined effects of chronic alcohol consumption and physical activity on bone health: study in a rat model. *Eur J Appl Physiol.* Dec;111(12):2931-40.

MCGEE-LAWRENCE ME. Y WESTENDORF JJ. (2011). Histone deacetylases in skeletal development and bone mass maintenance. *Gene*, 474:1–11

MORAN JM, RONCERO-MARTIN R, RODRIGUEZ-VELASCO FJ, CALDERON-GARCIA JF, REY-SANCHEZ P, VERA V, CANAL-MACIAS ML, PEDRERA-ZAMORANO JD. (2012). Effects of curcumin on the proliferation and mineralization of human osteoblast-like cells: implications of nitric oxide. *Int J Mol Sci.* 2012 Nov 29;13(12):16104-18.

PAPACHRONI KK., KARATZAS DN., PAPAVALASSILOU KA., BASDRA EK. Y PAPAVALASSILOU GP. (2009) Mechanotransduction in osteoblast regulation and bone disease. *Trends Mol Med.* 15(5):208-216.

PARFITT AM. (1991) B.K. Hall (Ed.) In *Bone, The Osteoblast and Osteocyte*. The Telford Press, London 351-426.

PECK WA. Y WOODS WL. (1998). The cells of bone. In *Osteoporosis: etiology, diagnosis and management*. New York: Raven Press.

- PEDRERA ZAMORANO-JD, LAVADO-GARCIA JM , RONCERO-MARTIN R , CALDERÓN-GARCÍA JF , RODRÍGUEZ-DOMÍNGUEZ T , CANAL-MACIAS ML. (2009). Effect of beer drinking on ultrasound bone mass in women. *Nutrition*. Oct;25(10):1057-63
- POULSEN RC, KRUGER MC. (2008) Soy phytoestrogens: impact on postmenopausal bone loss and mechanisms of action. *Nutr Rev*. Jul; 66 (7):359-74.
- PUZAS JE. (1996). Osteoblasts cell biology: lineage and functions. In *Primer of the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. Favus MJ., Editor Lippincott- Raven Press. New York, New York, USA. 1-16.
- RICO H, CANAL ML, MAÑAS P, LAVADO JM, COSTA C, PEDRERA JD. (2002) Effects of caffeine, vitamin D, and other nutrients on quantitative phalangeal bone ultrasound in postmenopausal women. *Nutrition*. Feb;18(2):189-93
- SHANKAR K, HIDESTRAND M, LIU X, CHEN JR, HALEY R, PERRIEN DS, SKINNER RA, LUMPKIN CK JR, BADGER TM, RONIS MJ. (2008) Chronic ethanol consumption inhibits postlactational anabolic bone rebuilding in female rats. *J Bone Miner Res*. 2008 Mar;23(3):338-49.
- SHANKAR K, HIDESTRAND M, HALEY R, SKINNER RA, HOGUE W, JOCH, SIMPSON P, LUMPKIN CK JR, ARONSON J, BADGER TM, RONIS MJ (2006). Different molecular mechanisms underlie ethanol-induced bone loss in cycling and pregnant rats. *Endocrinology*. Jan;147(1):166-78.
- SOLARI GARCIA, M. (2004). Las isoflavonas y su relación con la enfermedad renal y otras patologías crónicas concomitantes. Curso de postgrado: Enfermedad renal y Nutrición. Marzo, Buenos Aires.

- STARÝ V, DOUDĚROVÁ M, BAČÁKOVÁ L. (2013). Influence of surface roughness of carbon materials on human osteoblast-like cell growth. *J Biomed Mater Res A*. Jun 15.
- TAI TY, TSAI KS, TU ST, WU JS, CHANG CI, CHEN CL, SHAW NS, PENG HY, WANG SY, WU CH. (2012). The effect of soy isoflavone on bone mineral density in postmenopausal Taiwanese women with bone loss: a 2-year randomized double-blind placebo-controlled study. *Osteoporos Int*. 2012 May;23(5):1571-80.
- TUCKER KL, JUGDAOHSINGH R, POWELL JJ, QIAO N, HANNAN MT, SRIPANYAKORN S, CUPPLES LA, KIEL DP. (2009) Effects of beer, wine, and liquor intakes on bone mineral density in older men and women. *Am J Clin Nutr*. 2009 Apr;89(4):1188-96
- TURNER RT, IWANIEC UT, ANDRADE JE, BRANSCUM AJ, NEESE SL, OLSON DA, WAGNER L, WANG VC, SCHANTZ SL, HELFERICH WG. (2013) Genistein administered as a once-daily oral supplement had no beneficial effect on the tibia in rat models for postmenopausal bone loss. *Menopause*. Jun;20(6):677-86.
- VIGNESH RC, SITTA DJODY S, JAYASUDHA E, GOPALAKRISHNAN V, ILANGO VAN R, BALAGANESH M, VENI S, SRIDHAR M, SRINIVASAN N. (2006) Effect of ethanol on human osteosarcoma cell proliferation, differentiation and mineralization. *Toxicology*. Mar 1;220(1):63-70.
- VORNDRAN E, EWALD A, MÜLLER FA, ZORN K, KUFNER A, GBURECK U. (2011). Formation and properties of magnesium-ammonium-phosphate hexahydrate biocements in the Ca-Mg-PO₄ system. *J Mater Sci Mater Med*. 2011 Mar;22(3):429-36.

YADAV DK, GAUTAM AK, KUREEL J, SRIVASTAVA K, SAHAI M, SINGH D, CHATTOPADHYAY N, MAURYA R. (2011). Bioorg Med Chem Lett. Synthetic analogs of daidzein, having more potent osteoblast stimulating effect. Jan 15;21(2):677-81

YAMAGUCHI M (2012). Nutritional factors and bone homeostasis: synergistic effect with zinc and genistein in osteogenesis. Mol Cell Biochem. Jul;366(1-2):201-21

YONEZAWA T., LEE J-W., HIBINO A., ASAI M., HOJO H., CHA B-Y., TERUYA T., NAGAI K., CHUNG UI., YAGASAKI K. Y WOO J-T. (2011) Harmine promotes osteoblasts differentiation through bone morphogenetic protein signaling. Biochem, Biophys, Res Commun, 409(2):260-265.