
Distribución del número de núcleos en osteoclastos de cordero - The distribution of the number of nuclei in ovine osteoclasts

García Morán, Jesús Ildelfonso*: Centro de Salud de Belmonte P. Enrique Fernández s/n. 16640- Cuenca, España. E-mail: jgarciam@sescam.jccm.es | **Viejo Escribano, Guadalupe**: Puesto de Inspección Fronteriza Ampliación Muelle Sur, s/n Puerto de Valencia 46024- Valencia, España E-mail: guadalupe.viejo@map.es | **García Morán, Nicolás Pascual**: Puesto de Inspección Fronteriza Edificio Frigoluz. C/Unión Castleline s/n Puerto de la Luz. 35008 - Las Palmas de Gran Canaria-, España. E-mail: nicolaspascual.garcia@ap.mpr.es

Resumen

Los osteoclastos son células multinucleadas implicadas en la resorción ósea cuyo interés en biología celular y patología es cada vez mayor. Numerosos autores han estudiado la distribución de los núcleos en osteoclastos de varias especies para profundizar en su dinámica celular y así buscar modelos animales para enfermedades humanas. El objetivo es conocer dicha distribución en la especie ovina. Se estudiaron improntas de médula ósea obtenidas de vértebras torácicas de 30 corderos. Fueron teñidas con Diff-Quik y se contaron el número de núcleos en 204 osteoclastos. La curva de frecuencias fue de carácter asimétrico con una media de 8.3 ± 3.5 , una mediana de 6 núcleos por osteoclasto y un índice de curtosis de $-0,04$. Se puede concluir que el patrón de distribución de los núcleos en osteoclastos de la especie ovina es similar al de otros mamíferos, entre ellos, el hombre.

Palabras clave: osteoclastos | impronta | médula ósea

Abstract

The osteoclasts, multinucleated cells, are involved in bone resorption, a process with an increasing interest in cellular biology and pathology. Many authors have studied the distribution of nuclei in osteoclasts of

several species in order to go into cellular dynamics in depth and search models in animals to apply to human diseases. Our aim is to know the osteoclasts nuclei distribution in ovine species. Bone marrow preparations of thoracic vertebra of 30 lambs were studied, using Diff-Quik and counting the number of nuclei in 204 osteoclasts. The curve of the frequencies was asymmetric with an average of 8.3 ± 3.5 , a median of 6 nuclei per osteoclast and a kurtosis index of $-0,04$. We could conclude that the pattern of distribution of the nuclei of the osteoclasts in ovine is similar to other mammals, and then, to humans.

Key words: osteoclasts | imprint | bone marrow

INTRODUCCIÓN

El osteoclasto (OC) es una célula gigante multinucleada responsable de la resorción ósea y cuyo precursor es de origen hematopoyético (1-4).

Su actividad es esencial durante el desarrollo embriológico y posteriormente en el remodelado del esqueleto adulto, desempeñando un papel básico en la homeostasis del calcio como ocurre durante el embarazo o en la formación de la cáscara del huevo (2) (5).

Pero además, su potencial destructivo es bien conocido en algunas enfermedades humanas como la enfermedad de Paget, la artritis reumatoide o la osteoporosis (4-6), y en enfermedades animales como la hipervitaminosis A o las lesiones dentales por resorción osteoclástica de los felinos -FORL- (7).

Con todo ello no es extraño que el OC se haya convertido en un modelo en biología celular y una importante diana terapéutica (2) (3).

Por otra parte el número de núcleos del OC varía ampliamente, reflejando diferencias tanto en la especie como en su actividad funcional. Este patrón de distribución de los núcleos ha sido estudiado especialmente en aves y ratas (8) (9) (10) pero no en la especie ovina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron 30 corderos de raza manchega de 6 meses de edad y un peso aproximado de 30 Kgrs. La inspección *premortem* y *postmortem* fue normal. Fueron sacrificados en un matadero por

degüello previa insensibilización eléctrica. De cada uno se utilizó la vértebra torácica T-9 por su fácil accesibilidad. Con un bisturí se rompieron las trabéculas del cuerpo vertebral y mediante una leve presión sobre un portaobjetos se obtuvieron 6 improntas por cada vértebra. Una vez secados al aire, se tiñeron con Diff-Quik. Se trata de una tinción que permite un procesamiento más rápido que el Papanicolau y ofrece tonalidades idénticas al May-Gründwald-Giemsa.

Brevemente, los portaobjetos se fijan en triarilmetano y metanol. Posteriormente son introducidos 5 veces durante 20 segundos en una solución acidófila de xantheno y después de lavados con agua destilada, se introducen 5 pases de 20 segundos en una solución basófila de thyazina.

El recuento de OC se hizo por barrido de 20 campos por cada portaobjetos tomados al azar con un objetivo de x125 usando un microscopio Wild Heerbrugg.

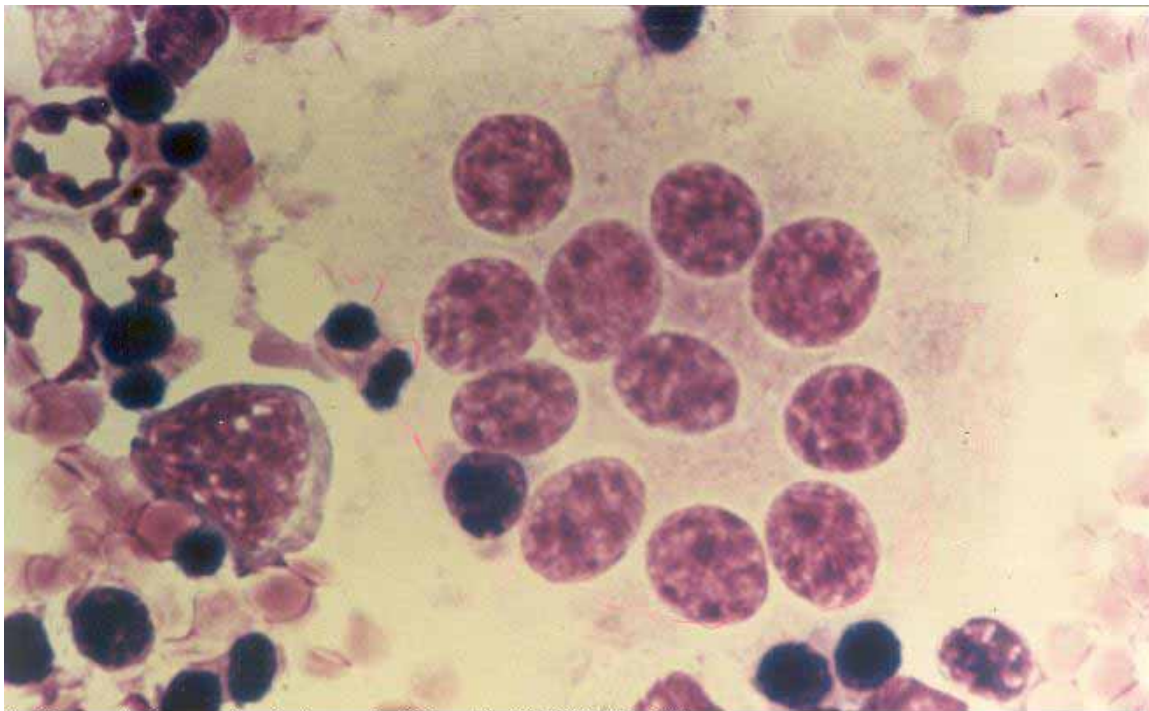


Fig.1. Impronta de un osteoclasto con 11 núcleos. Tinción Diff-Quik. x1000

Se contaron el número de núcleos ($n^{\circ}N$) de cada OC ($n^{\circ}N/OC$). Como criterios de OC se utilizaron los siguientes: célula grande de citoplasma ligeramente eosinófilo o anfófilo y con al menos 3 núcleos bien delimitados, gránulos de cromatina dispersos uniformemente y 1 ó 2 nucléolos prominentes (Fig.1).

El estudio estadístico se realizó con el programa G-Stat. Los resultados se expresan como media±desviación standard.

RESULTADOS

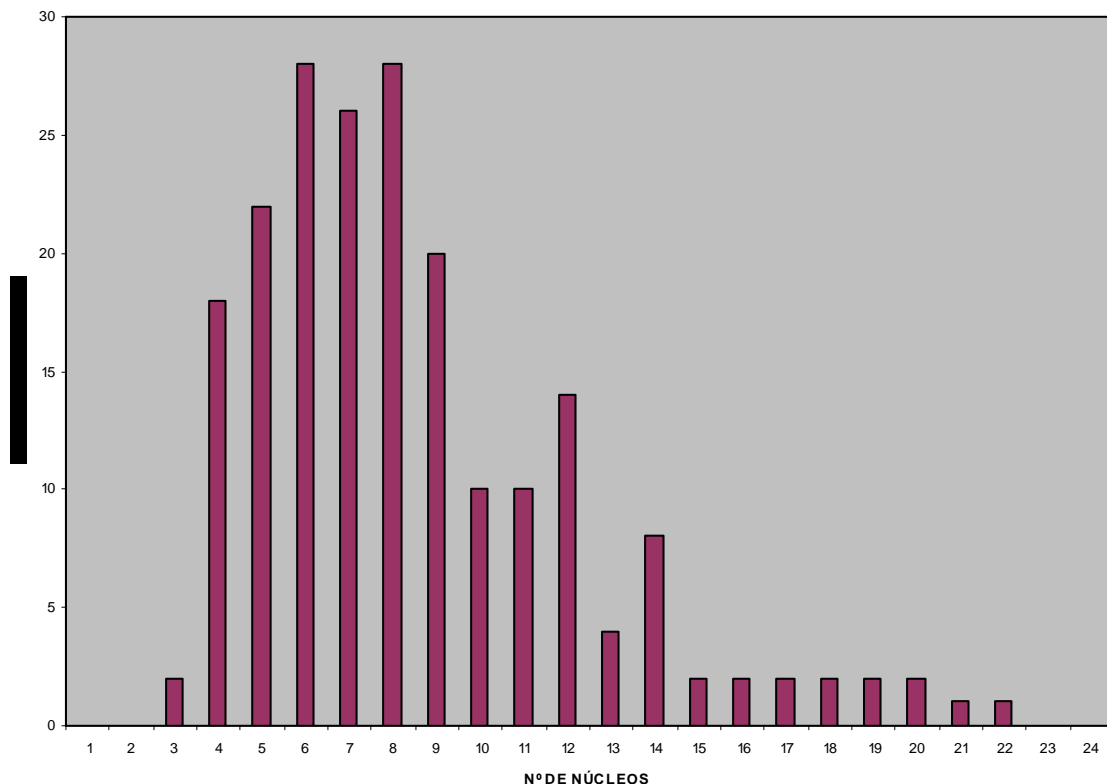
Se contaron un total de 204 OC. La media de número de OC por portaobjetos fue de $6,8 \pm 2,1$.

El rango de nºN fue de 3-22. La media de nºN/OC fue de $8,3 \pm 3,5$. Otras medidas de tendencia central fueron la mediana de 6 y la moda de 8 núcleos.

El índice de Curtosis fue de $-0,04$. Por otro lado el 76,2% de los OC tenían 10 ó menos núcleos.

En el Fig.2 se muestra la distribución de frecuencias del nº N/OC.

FIG.2 DISTRIBUCIÓN DEL Nº DE NÚCLEOS/OSTEOCLASTO



Histograma de frecuencias. Se observa una distribución asimétrica de número de núcleos por osteoclasto.

DISCUSIÓN

El OC fue descrito por primera vez por Kölliker en 1897 con el nombre de "ostoklast" en alusión su carácter destructor y es la célula responsable de la resorción ósea (11).

Los experimentos de parabiosis, quimeras de pollo-codorniz y la curación de la osteopetrosis mediante trasplante de médula ósea han establecido que el OC es miembro del sistema monocito-macrófago originado por fusión celular (4). La única excepción son los teleosteos donde los odontoclastos ,OC responsables de la resorción dental, son mononucleares y forman agregados individuales (12). Esta fusión está gobernada tanto por factores hormonales como paracrinos y autocrinos (13).

Por otra parte el interés suscitado por el estudio OC viene determinado por ser la célula sobre la que pivota frecuentes enfermedades tanto humanas como animales (4).

La actividad resortiva del OC viene precedida por cambios en su citoesqueleto. En último término éstos son los responsables de su polarización, es decir del desarrollo del borde fruncido , la zona clara y la localización de los núcleos en la zona basolateral (4) (14) (15). Los OC adquieren continuamente nuevos núcleos a través de la fusión con células precursoras mononucleares hasta alcanzar un volumen que permite una mayor eficiencia en la resorción (9).

Aunque en la actualidad las técnicas moleculares han ido desplazando a las citológicas, el número de núcleos es expresión morfológica de la capacidad funcional del OC (16). Así está bien establecido que existe una alta correlación entre nºN del OC y hueco excavado en el hueso (8) (9) (10) (16). Por otro lado en la enfermedad de Paget, caracterizada por un remodelado acelerado, se han llegado a describir OC con más de 100 núcleos (17).

Sin embargo también el nºN en OC puede variar en función de la especie estudiada, de la localización del tejido óseo y de las condiciones experimentales (18). Para el estudio cuantitativo de los OC se han venido utilizado diversas técnicas como los cortes histológicos (19), los cultivos celulares (16) y las improntas de médula ósea (20).

En relación a las especies es clásico afirmar que son más numerosos en gatos que en ratones (18). Estudios con autorradiografía en médula ósea de codorniz durante la puesta muestran una media de 3.6 núcleos

(21), de 6 en ratas (10) y en periostio de la tibia del pollo de 6,9 núcleos (8). Addison, uno de los pioneros en este campo, encuentra una media de 5.5 núcleos en médula ósea de gatos pequeños (20).

Nosotros hemos utilizado la impronta de médula ósea de esqueleto axial por tres razones. Técnicamente es la más accesible, los OC son relativamente fáciles de identificar en el tejido hematopoyético y además es más rentable que los cortes histológicos (20). En nuestro caso hemos encontrado una media ligeramente superior de 8,3 núcleos. Aunque estas diferencias pueden ser explicadas en parte por la metodología utilizada, también hay que considerar que la resorción ósea puede variar en función de la localización del hueso estudiado (esqueleto axial *versus* apendicular) (22), incluso se han descrito diferencias en un mismo hueso (23).

Aunque nuestro estudio es exclusivamente observacional, otro factor que puede influir en la actividad resortiva del OC son las condiciones experimentales. Es conocido desde hace tiempo como el hueso se remodela siguiendo las líneas de fuerza determinadas por la sobrecarga ósea (5) mediante una supresión de la diferenciación del OC (24). Por otro lado durante la curación de una fractura o los periodos de crecimiento, embarazo y lactancia existe una mayor actividad de OC con el objetivo de movilizar más calcio y cubrir las necesidades aumentadas de éste (25) (26).

Un hecho constante en todos los animales estudiados es la presencia de una distribución asimétrica de n^oN en los OC. De tal manera que en el conejo los OC con más de 10 núcleos representan 10% (27), en el gato el 5% (20), un 11% en ratas (9) y el 19% en el pollo (8). En el trabajo aportado por nosotros sólo el 23,8% de los OC de cordero tenían más de 10 núcleos.

En este sentido se ha propuesto que es necesario un número óptimo de núcleos para conseguir una máxima eficiencia (10) (16) (20). Por encima de este número óptimo los OC entrarían en apoptosis y serían retirados del tejido óseo por fagocitosis (2).

En conclusión la distribución del n^oN/OC en tejido óseo vertebral de cordero no difiere de la de otras especies, reflejando que su dinámica poblacional es esencialmente la misma.

BIBLIOGRAFÍA

1. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*.2003;423: 337-342.
2. Manolagas SC. Birth and Death of Bone Cells:Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis. *Endocrine. Reviews*.2000;21(2): 115-137.
3. Väänänen H K, Zhao H, Mulari M, Halleen JM. The cell biology of osteoclast función. *J Cell Sci*. 2000;113: 377-381.
4. Teitelbaum SL. Osteoclasts: What Do They Do and How Do They Do It? *Am.J.Pathol*. 2007;170:427-435.
5. Frost HM. From Wolff´s law to Utah paradigm: insights about bone physiology and its clinical implications. *Anat.Rec*.2001:262: 398-419.
6. Schett G. Joint remodelling in inflammatory disease.*Ann. Rheum. Dis*.2007; 66 (Supplement 3): 42-44.
7. Muzylak M, Arnett TR ,Price JS, Horton MA.. The in vitro effect of pH on osteoclasts and bone resorption in the cat: Implications for the pathogenesis of FORL. *J Cell. Physiol*. 2007;213: 144-150.
8. Piper K, Boyde A, Jones SJ. The relationship between the number of nuclei of an osteoclasts and its resorptive capability in vitro. *Anat Embryol (Berl)*.1992;186 (4):291-299.
9. Ries WL, Gong JK, Gunsollery JC. The distribution and kinetics of nuclei in rat osteoclasts. *Cell Tissue Kinet*.1987;20(1): 1-14.
10. Roennfeldt N, Fujii H, Zheng MH, Seydell U. Nucleolar organizer regions (Ag-NORs) in multinuclear osteoclast. *J Bone Miner Metab*.1998;16:227-233.
11. Hall B K. Bone. En: Hall BK, editor. *Bones and cartilage: developmental and evolutionary skeletal biology*.London. Elsevier.Academic Press. 2005:13-32.
12. Domon T, Fukui A, Taniguchi Y, Suzuki R, Shigeru Takahashi S, Yamamoto T, Wakita M. Odontoclasts in the Chinook salmon differ from mammalian odontoclasts by exhibiting a great proportion of cells with high nuclei number. *Anat Embryol* 2004;209: 119–128.
13. Muñoz-Torres M, de la Higuera López-Frías M, Fernández García D. Avances en el conocimiento de la biología del osteoclasto: el sistema osteoprogeretina-ligando de RANK. *Med Clín*.2004;122 (2): 75-77.
14. Takahashi N, Ejiri S, Yanagisawa S, Ozawa H. Regulation of osteoclast polarization. *Odontology*.2007;95: 1-9.
15. Szuwart T, Kierdorf H, Kierdorf U, Clemen G. Histochemical and ultrastructural studies of cartilage.The resorption and acid phosphatase activity during antlers growth in fallow deer (*Dama dama*). *Anat. Rec*.2002;268: 66-72.
16. Boissy P, Saltel F, Bouniol C, Jurdic P, Machuca-Gayet I. Transcriptional Activity of Nuclei in Multinucleated Osteoclasts and Its

- Modulation by Calcitonin Endocrinology. 2002;143 (5) 1913-1921.
17. Roodman GD, Windle JJ. Paget disease of bone. J.Clin.Invest.2005;115 (2): 200-208.
 18. Baron R. Anatomy and ultrastructure of bone.En: Murray JF, editor . Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism .Lippincott Raven. Philadelphia.1999:3-9.
 19. Ries WL, Gong JK. A comparative study of osteoclasts : in situ versus smear specimens. Anat Rec.1982 :203 :221-232.
 20. Addison WCJ. The distribution of nuclei in imprints of feline osteoclasts. J. Anat. 1979;129 (1):63-68.
 21. Miller SC. Osteoclast cell-surface specializations and nuclear kinetics during egg-laying in Japanese quail. Am J Anat.1981;162(1):35-43.
 22. Everts V, Korper W, Jansen DC, Steinfort J, Lammerse I, Heera AJP et al. Funcional heterogeneity of osteoclast: matrix metalloproteinases participate in osteoclastic resorption of calvarial bone but not in resorption of long bone. FASEB J.1999;13:1219-1230.
 23. Liu CC, Baylink DJ. Differential response in alveolar bone osteoclasts residing at the different bone sites. Calcif Tissue Int.1984;36 (2):182-188.
 24. Suzuki N, Yoshimura Y, Deyama Y,Suzuki K, Kitagawa Y. Mechanical stress directly suppresses osteoclast differentio in RAW264.7 cells. Int J Mol Med.2008;21 (3):291-296.
 25. Schell H, Lienau J, Epan DR, Seebeck P, Exner C, Muchow S et al. Osteoclastic activity begins early and increases over the course of bone healing. Bone.2006;38 (4):547-554.
 26. Miller SC, Bowman BM. Rapid inactivation and apoptosis of osteoclasts in maternal skeleton during the bone remodeling reversal at the end of lactation. Anat.Rec.2007;290 (1):65-73.
 27. Lees RL, Heersche JN. Differences in regulation of pH(i) in large (>/=10 nuclei) and small(</=5nuclei) osteoclasts.Am J Physiol Cell Physiol. 2000 Sep;279(3):C751-761.

REDVET: 2009 Vol. 10, Nº 12

Recibido 21.10.08 - Ref. prov. T022B - Revisado 08.01.09 - Aceptado 16.11.09
Ref. def. 120903_RED VET - Publicado 15.12.09

Este artículo está disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111109.html>
concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n121209/120903.pdf>

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®

Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con Veterinaria.org® <http://www.veterinaria.org>
y con REDVET® - <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> - <http://revista.veterinaria.org>