



**EL SECOIRIDOIDE DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN
EXTRA OLEOCANTAL COMO INHIBIDOR DE LA
OSTEOCLASTOGÉNESIS**

ANA IGLESIAS GARCÍA
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA



FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Trabajo Fin de Grado Experimental
Grado en Farmacia

**EL SECOIRIDOIDE DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN
EXTRA OLEOCANTAL COMO INHIBIDOR DE LA
OSTEOCLASTOGÉNESIS**

Realizado por: Ana Iglesias García

Dirigido por: María Ángeles Rosillo Ramírez.

Facultad de Farmacia, Sevilla.

Junio, 2023

RESUMEN

Un desequilibrio en la homeostasis ósea puede suponer la aparición de ciertas patologías como la osteoporosis (OP), artritis reumatoide (AR), metástasis óseas líticas y enfermedad ósea de Paget. Oleocantal (OLE), un secoiridoide característico y exclusivo de la familia *Oleaceae*, se encuentra principalmente en el aceite de oliva virgen extra (AOVE). Estudios previos han demostrado sus efectos antioxidantes, antiinflamatorios, antimicrobianos, anticancerígenos y neuroprotectores.

El objetivo de este estudio ha sido estudiar el funcionalismo de este secoiridoide en un modelo de osteoclastogénesis inducida por M-CSF y RANKL a partir de células de médula ósea de ratón y dilucidar los posibles mecanismos moleculares involucrados.

Los macrófagos de la médula ósea fueron aislados de los huesos de ratones CD1 y estimulados con M-CSF/RANKL en presencia o ausencia del tratamiento con OLE (25, 50 y 100 μ M). Tras el tratamiento, se realizaron ensayos de viabilidad celular (SRB), tinción y actividad TRAP, determinación de los niveles de citoquinas (IL-6 y TNF- α) y expresión de genes marcadores de osteoclastos (NFATc1, TRAP, MMP-9 y CTSK) mediante qPCR.

Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con OLE no afecta a la viabilidad celular a las concentraciones ensayadas (25, 50 y 100 μ M). OLE fue capaz de reducir significativamente el número de células multinucleadas TRAP-positivas y la actividad de dicha enzima. El tratamiento con el secoiridoide (50 y 100 μ M), produjo una disminución significativa de los niveles de IL-6 y TNF- α . Además, pudimos observar que OLE reguló la expresión genética de NFATc1, TRAP, MMP-9 y CTSK.

Estos resultados nos permiten concluir que OLE podría formar parte de nuevos tratamientos destinados a patologías óseas con exacerbación de la osteoclastogénesis por inhibir la diferenciación de osteoclastos junto a su capacidad antiinflamatoria.

Palabras clave: osteoclastogénesis, oleocantal, homeostasis, osteoclasto, osteoblasto.

ÍNDICE

RESUMEN	2
ABREVIATURAS Y SIGLAS	4
INTRODUCCIÓN.....	5
<i>Homeostasis del hueso</i>	5
<i>Oleocantal</i>	8
- <i>Actividad farmacológica del oleocantal</i>	10
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	14
METODOLOGÍA.....	15
I. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	15
II. EXTRACCIÓN DE LA MÉDULA ÓSEA Y DIFERENCIACIÓN A OSTEOCLASTOS.....	15
III. VIABILIDAD CELULAR (SRB)	16
IV. TINCIÓN Y ACTIVIDAD TRAP.....	17
V. DETERMINACIÓN DE CITOCINAS	18
VI. EXPRESIÓN GÉNICA	18
VII. ESTUDIO ESTADÍSTICO.....	19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
I. EFECTO DEL OLEOCANTAL EN LA VIABILIDAD CELULAR.....	20
II. TINCIÓN Y ACTIVIDAD TRAP	21
III. INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO CON OLEOCANTAL EN LA EXPRESIÓN DE LAS CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS IL-6 Y TNF- α	22
IV. EFECTO DEL OLEOCANTAL EN LA EXPRESIÓN DE GENES.....	24
CONCLUSIONES.....	27
BIBLIOGRAFÍA	28

ABREVIATURAS Y SIGLAS

ADNc	ADN complementario
AOVE	Aceite de oliva virgen extra
AR	Artritis reumatoide
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
A β	Proteína β -amilode
BMMs	Macrófagos de la médula ósea
COX	Enzima ciclooxigenasa
CTSK	Catepsina K
IFN	Interferón
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintasa
JNK	Quinasa N-terminal c-Jun
LPS	Lipopolisacáridos
MAPK	Protein-quinasas activadas por mitógeno
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
MIP-1 α	Proteína inflamatoria de macrófagos
MMP-9	Metaloproteasa de matriz 9
mPGES-1	Prostaglandina E sintasa 1 microsomal
NFATc1	Factor nuclear de células T activadas c 1
NF- $\kappa\beta$	Factor nuclear $\kappa\beta$
NO	Óxido nítrico
NOX	Enzima NADPH oxidasa
OLE	Oleocantal
OP	Osteoporosis
pOC	Osteoclastos prefusión
RANK	Receptor activador del factor nuclear $\kappa\beta$
RANKL	Ligando del receptor activador del factor nuclear $\kappa\beta$
ROS	Especies reactivas de oxígeno
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRAP	Fosfatasa alcalina resistente al tartrato

INTRODUCCIÓN

Homeostasis del hueso

El hueso es un tejido muy importante de nuestro cuerpo, ya que brinda soporte y protección a los tejidos blandos, regula la homeostasis mineral y mantiene el microambiente de la cavidad medular (Zhang et al., 2022). A su vez, el hueso es un tejido dinámico, y la remodelación ósea es crucial no solo para reemplazar huesos primarios con huesos secundarios, sino también para reparar microdaños en el esqueleto y garantizar una homeostasis normal del calcio. Los osteoclastos y osteoblastos están involucrados en la remodelación ósea y tienen la función secuencial de reabsorber hueso viejo y formar hueso nuevo a través de un mecanismo bien coordinado regulado por diferentes factores, como hormonas sistémicas, factores de crecimiento local, citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión y proteínas de la matriz extracelular (Kenkre y Bassett, 2018). Estos factores son secretados por las células de la superficie ósea y producidos por los osteocitos ubicados en la matriz ósea, que representan el otro tipo de células que, junto con las células del revestimiento óseo, están involucradas en la remodelación ósea (Robling y Bonewald, 2020).

En particular, los osteoblastos proceden de células madre mesenquimales pluripotentes (BMSC), que tienen la capacidad de diferenciarse en condrocitos y adipocitos. La diferenciación de las BMSC hacia la osteogénesis está regulada por varias proteínas morfogenéticas óseas (BMP) y vías de señalización Wnt (Zhou et al., 2021) a través de la activación de β -catenina, que se estabiliza por la hormona paratiroidea involucrada en la homeostasis del calcio (Bonnet et al., 2012). Los osteoblastos activos sintetizan y secretan colágeno tipo I, la principal proteína de la matriz ósea y proteínas no colágenas, como la osteocalcina, la osteopontina y la osteonectina, y son ricos en fosfatasa alcalina (ALP), un biomarcador de la función osteoblástica que es muy importante en la mineralización de la matriz ósea. Además, los osteoblastos controlan la osteoclastogénesis a través de la vía de señalización Wnt y la secreción de osteoprotegerina (OPG) y citocina relacionada con el factor de necrosis tumoral (TNF) denominada RANKL. De hecho, OPG regula a la baja la osteoclastogénesis, mientras que RANKL la regula al alza (Iantomasi et al., 2023).

Por otro lado, los osteoclastos son células multinucleadas de gran tamaño que derivan de células del linaje monocitos/macrófagos mediante la activación de receptores por dos factores, el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y el RANKL. M-CSF regula principalmente la proliferación y supervivencia de precursores de osteoclastos y células maduras. RANKL es el principal factor de diferenciación de osteoclastos, y su interacción con el receptor RANK, resulta en la activación de la vía de señalización del factor nuclear MAP, que se desplaza al núcleo, donde activa al factor nuclear de células T activadas c 1 (NFATc1). NFATc1 tiene un papel importante en la regulación de varios genes específicos de osteoclastos, incluida la metaloproteasa de matriz 9 (MMP-9), la catepsina K (CTSK), la fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP) (Ding et al., 2023; Kim y Kim, 2016), el receptor asociado a osteoclastos (OSCAR), el receptor de la calcitonina (Yavropoulou y Yovos, 2008) y la integrina b3 (Mikán y Oliveros, 2007).

La interacción RANKL/RANK desencadena otras vías de señalización que también activan al NFATc1. Estas vías ocurren a través de las protein-quinasas activadas por mitógeno (MAPK), principalmente p38, ERK1 y la quinasa N-terminal c-Jun (JNK) (An et al., 2016) y la calmodulina calcio-dependiente (Yavropoulou y Yovos, 2008).

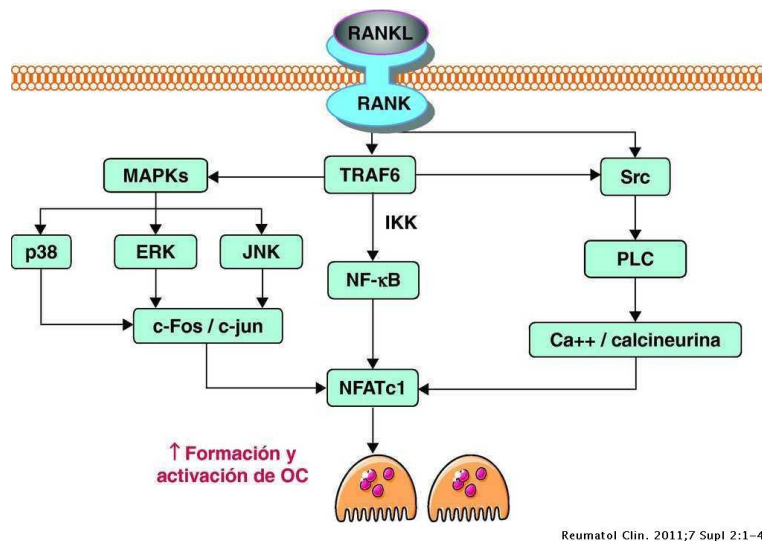


Figura 1. Diferenciación de osteoclastos mediada por la vía RANKL/RANK (Riancho y Delgado-Calle, 2011).

RANKL, al igual que M-CSF, puede prolongar la supervivencia y la fusión de osteoclastos prefusión (pOC) (figura 2). Sin embargo, la actividad resortiva de hueso solo

puede inducir la RANKL. La citocina IL-1, expresada en situaciones patológicas como periodontitis o artritis reumatoide (AR), puede intervenir en la osteoclastogénesis activando al factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) y JNK y dando lugar a osteoclastos maduros y activos. No obstante, no produce proliferación ni diferenciación de osteoclastos por sí misma (Suda et al., 1999) lo que sugiere que hay otros mecanismos independientes de la activación de la vía RANKL/RANK involucrados en este proceso (Kim y Kim, 2016).

La formación de osteoclastos continúa con el contacto de un pOC con la superficie mineralizada del hueso, lo que induce la inmovilización de la célula y el cambio en su patrón de expresión a célula aceptora de fusión. Otros pOC migran y son guiados por quimiotaxis al sitio específico donde se va a producir resorción ósea. La fusión una a una de los pOC con la célula aceptora es un proceso regulado por la proteína transmembrana específica de células dendríticas (DC-STAMP) y da lugar al osteoclasto multinucleado. Algunos de los factores quimiotácticos son el factor 1 derivado de células del estroma (SDF-1) o los factores RANKL, M-CSF y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), liberados por células de la superficie ósea y osteocitos en apoptosis (Chiu y Ritchlin, 2016; Sjøe et al., 2021).

Por último, el osteoclasto se activa tras una polarización en la membrana y una remodelación del citoesqueleto, obteniendo como resultado un osteoclasto maduro y funcional (Boyle et al., 2003). El osteoclasto maduro se posiciona en contacto con el hueso a través del ribete en cepillo, zona a través de la cual se lleva a cabo la resorción del hueso. En esta zona se encuentran los canales de protones y cloruro necesarios para acidificar el medio y disolver la hidroxiapatita. Además, actúan los lisosomas secretando CTSK y diversas metaloproteasas que disuelven la matriz orgánica (Arbolea y Castañeda, 2014).

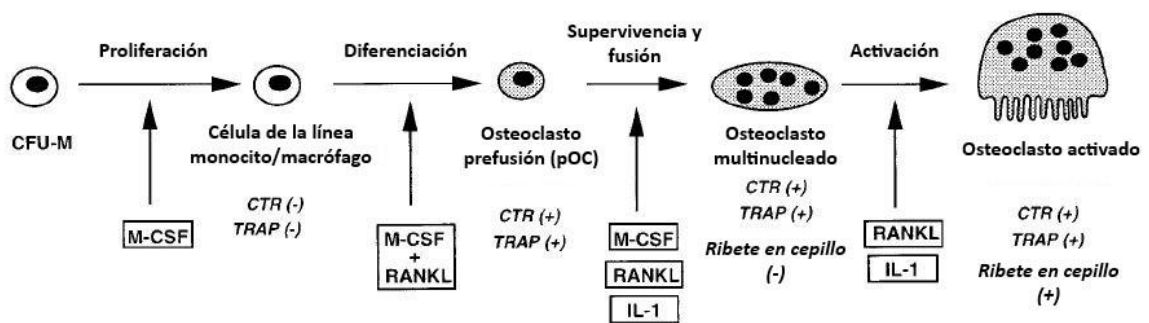


Figura 2 modificada (Suda et al., 1999). Esquema de la osteoclastogénesis.

Como se ha mencionado anteriormente, la osteoclastogénesis está regulada por diversas hormonas y factores locales entre los cuales se encuentran los estrógenos.

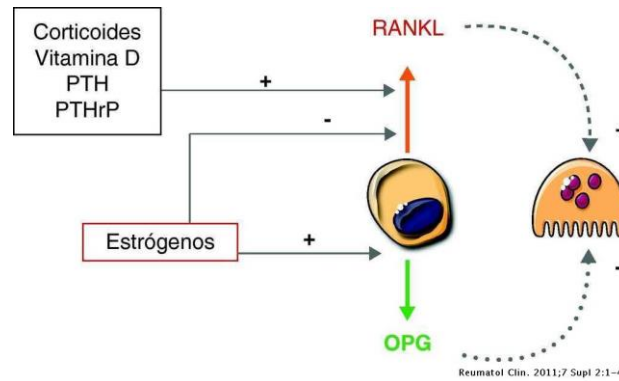


Figura 3. Regulación de la osteoclastogénesis por varios factores endocrinos (Riancho y Delgado-Calle, 2011).

Los receptores de estrógeno se encuentran presentes tanto en osteoblastos como en osteoclastos. Los estrógenos son protectores de la densidad mineral ósea y pueden promover el crecimiento del hueso ya que aumentan la supervivencia de los osteoblastos y osteocitos. Sin embargo, su principal actividad es reducir la actividad de los osteoclastos, para ello promueven su apoptosis actuando directamente como factores de transcripción o desencadenando cascadas de señales citoplasmáticas a través de las MAPK. Además, actúan en osteoblastos y osteocitos aumentando la síntesis de OPG e inhibiendo la producción de RANKL (An et al., 2016; Katsimbri, 2017).

El descenso de los niveles de estrógeno sumado al aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la disminución de la defensa antioxidante del organismo explica la tendencia a la osteoporosis (OP) en mujeres postmenopáusicas (An et al., 2016). Además del aumento de ROS, la producción patológica de citocinas inflamatorias tales como la IL-1 β , TNF- α y IL-6 incrementan el proceso osteoclastogénico observado en patologías relacionadas con la debilidad ósea (Chin y Ima-Nirwana, 2016; Fernando Mikán y William Darío Oliveros, 2007).

Oleocantal

El aceite de oliva virgen extra (AOVE) es un producto obtenido por extracción mecánica de los frutos de la especie *Olea europaea* L. que constituye una de las

principales fuentes de grasa en la dieta Mediterránea (Tripoli et al., 2005). Este suceso se ha relacionado con una menor incidencia de accidentes cardiovasculares, cáncer, diabetes tipo 2, cataratas y fracturas osteoporóticas en la población de estas regiones (Castejón et al., 2020; Francisco et al., 2019; Tripoli et al., 2005).

El AOVE está compuesto principalmente por contenido lipídico en el que destaca el ácido oleico, ácido graso monoinsaturado (MUFA). Sin embargo, una fracción minoritaria entre el 1-2% del contenido total está compuesta por la fracción insaponificable. Son metabolitos secundarios producidos por el olivo tales como el escualeno, tocoferol, terpenos, pigmentos y compuestos fenólicos entre otros (Segura-Carretero y Curiel, 2018). Los polifenoles engloban a diversos tipos de estructuras entre los cuales se encuentran los secoiridoides y dentro de ellos el (-)-descarboximetil ligustrósido aglicona, también denominado oleocantal (OLE), aislado e identificado en 2005 por Beauchamp et al. (Iacono et al., 2010; Montoya et al., 2021). OLE es un éster del tirosol y está relacionado químicamente con la oleuropeína, otro compuesto fenólico presente en el olivo (Geromichalou y Geromichalos, 2022).

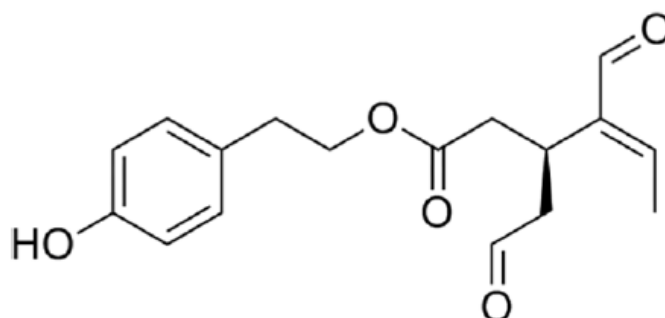


Figura 4. Estructura química del oleocantal.

En general el contenido de OLE representa el 10% de los compuestos fenólicos del aceite, aunque la proporción puede variar según numerosos factores relacionados con el cultivo del olivo y las técnicas agrícolas empleadas, con la localización demográfica y las técnicas de obtención y almacenamiento del aceite. De hecho, se conoce que el contenido de OLE disminuye en gran medida debido a los procesos metabólicos que ocurren en la maduración de la aceituna e incluso no está presente en ciertas variedades de olivos (Castejón et al., 2020; Montoya et al., 2021).

Los secoiridoides se liberan de la aceituna en los procesos de trituración y batido donde ocurre la hidrólisis de los glucósidos fenólicos catalizada por la β -glucosidasa, produciéndose los derivados del aglicón o secoiridoides (Lozano-Castellón et al., 2020).

En cuanto a su biodisponibilidad se conoce que se absorbe en el intestino delgado a través de difusión pasiva y es estable hasta cuatro horas a 37°C en el estómago. Además, el metabolismo es llevado a cabo principalmente a través de reacciones de fase 1, aunque también sucede a través de glucuronidación, mientras que no se han encontrado en estudios humanos formas metiladas o sulfonadas de OLE (Castejón et al., 2020).

- *Actividad farmacológica del oleocantal*

Según la evidencia actual, OLE ha mostrado actividad como antioxidante, antiinflamatorio, neuroprotector, preventivo en diversos tipos de cáncer y enfermedades reumáticas (Romani et al., 2019) y antibacteriano (Pang y Chin, 2018).

Efecto antiinflamatorio y antioxidante

La actividad biológica de OLE es principalmente antiinflamatoria ya que inhibe la expresión de las enzimas ciclooxigenasas 1 y 2 (COX-1 y COX-2) y 5-Lipooxigenasa (5-LOX), lo que conlleva disminución en la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos que intervienen en procesos inflamatorios. Además, se ha demostrado en macrófagos peritoneales de ratón tratados con lipopolisacárido (LPS) que puede modular negativamente la producción de mediadores proinflamatorios tales como IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-17, IL-18 e IFN- γ (Montoya et al., 2021).

OLE puede reducir los niveles de óxido nítrico (NO) a través de una regulación negativa de la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS). También se han detectado niveles reducidos de la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-1 α) y el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) en macrófagos de la línea celular J774A.1 (Francisco et al., 2019; Pang y Chin, 2018). Asimismo, se ha demostrado el efecto antiinflamatorio de OLE a través de la inhibición de las vías MAPK y NF- κ β en condrocitos humanos primarios, modelo osteoartrítico (Scotece et al., 2018).

Por último, se ha confirmado que OLE posee capacidad antioxidante ejerciendo como inhibidor intracelular de los niveles de ROS en estudios con células tanto murinas como humanas y se ha mencionado que podría también inhibir a la enzima NADPH oxidasa (NOX) en monocitos humanos (Castejón et al., 2020).

Actividad antiproliferativa

Existen diversos estudios tanto *in vivo* como *in vitro* respecto al efecto quimiopreventivo de OLE, algunos de ellos representados en la tabla 1. Este efecto lo ejerce a través de varios mecanismos como inhibición de HGF inducida por c-Met, (Moral y Escrich, 2022), inhibición del transductor de señal y activador de transcripción 3 (STAT3) o modulación de la apoptosis (El Haouari et al., 2020), entre otros.

Tabla 1. Estudios *in vivo* e *in vitro* acerca de la actividad antiproliferativa de OLE.

Sujeto de ensayo	Concentración OLE	Efecto farmacológico	Referencia
Líneas celulares MDA-MB-231, MCF-7 y células de cáncer de próstata humano PC3	0-20 μ M	OLE produjo inhibición de la proliferación, migración e invasión del tejido epitelial mamario humano y de próstata.	(Elnagar et al., 2011)
Línea MDA-MB-231/GFP	5 mg/kg	Inhibe c-Met, Ki-67, CD31 y reduce el crecimiento celular	(El Haouari et al., 2020)
Ratones MMTV-PyVT	7,5 mg/kg intragástrico	Supresión inicio e incidencia carcinogénesis mamaria	(Moral y Escrich, 2022)
Líneas celulares de cáncer mamario y MDA-MB-231	708 nM	Efecto antiproliferativo y regulación negativa de la expresión de mTOR fosforilada en MDA-MB-231	(Khanfar et al., 2015)
BT-474 y MDA-MB-231	10 mg/kg	En efecto sinérgico con Lapatinib (12,5 mg/kg), inhibición del crecimiento de cáncer de mama HER2+	(Siddique et al., 2019)

Actividad en lupus eritematoso sistémico

Se demostró en un modelo experimental in vivo de lupus eritematoso sistémico inducido por pristano en ratones que suplementar la dieta con OLE aminoró las manifestaciones renales a través de la inhibición de la expresión de proteínas relacionadas con la respuesta inflamatoria (iNOS, COX-2, prostaglandina E sintasa-1 microsomal (mPGES-1)) y la deposición de complejos de inmunoglobulinas. También reguló la expresión de citoquinas proinflamatorias Th1/Th17 en macrófagos peritoneales y esplenocitos y normalizó la función endotelial de la aorta torácica (Montoya et al., 2023).

Efecto neuroprotector

El Alzheimer es una de las enfermedades neurodegenerativas más comunes de demencia. Las manifestaciones de esta patología tienen su origen en acumulación extracelular de proteína β -amilode ($A\beta$) y depósitos intracelulares de proteína tau hiperfosforilada que forman ovillos neurofibrilares (Calsolaro y Edison, 2016). Se ha demostrado que la administración de OLE ejerce efecto neuroprotector y retrasa el proceso neurodegenerativo. OLE ejerce esta acción a través de una disminución en la formación y aumento en la eliminación de agregados $A\beta$ en las neuronas, principalmente por el paso a través de la barrera cerebro-sangre (demostrado en ratones utilizando el cultivo celular humano hCMEC/D3). Esto sucede debido a que incrementa la expresión de dos proteínas transportadoras, la glicoproteína P (P-gp) y la proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP-1), demostrado experimentalmente en la línea celular bEnd3 y un modelo in vivo de ratones con fenotipo salvaje. Además, en el modelo murino actúan las proteínas de aclaramiento de $A\beta$ IDE y neprilisina. OLE también actúa eliminando $A\beta$ a través de la vía de señalización Apo-E y reduce la inflamación disminuyendo la activación de astrocitos, los niveles de IL-1 β y la proteína ácida fibrilar gliar (GFAP) (Dinda et al., 2019).

Respecto a los ovillos neurofibrilares OLE produjo una disminución de la fibrilación de la proteína tau (Tau-441) a 10 μ M (Dinda et al., 2019).

Por último, la disfunción mitocondrial está implicada en el envejecimiento cerebral y en el Alzheimer. El tratamiento con OLE demostró un aumento en los niveles basales de adenosín trifosfato (ATP) mitocondrial en células SH-SY5Y-APP695 (Grewal et al., 2020).

Artritis reumatoide

El proceso inflamatorio y el estrés oxidativo están vinculados en la AR. En el artículo publicado por Montoya et al., 2021 se estudió el efecto de la administración en la dieta de OLE en ratones macho DBA-1/j sobre la artritis inducida por colágeno, obteniéndose como resultado la disminución de diversas citoquinas proinflamatorias, así como de la MMP-3 (responsable de la degradación de colágeno y proteoglicano entre otras moléculas) y la inhibición de la sobreexpresión de COX-2, mPGES-1 e iNOS (Montoya et al., 2021) lo que abre la posibilidad del empleo de OLE para el tratamiento de esta patología.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La homeostasis ósea es un proceso complejo y dinámico que implica el equilibrio de fuerzas impulsoras opuestas para la reabsorción ósea por parte de los osteoclastos y la formación ósea por parte de los osteoblastos. La alteración de la homeostasis ósea a favor de los osteoclastos conduce a la manifestación de varias condiciones patológicas, como OP, AR, metástasis óseas líticas y enfermedad ósea de Paget, entre otras (Boyle et al., 2003; Rosillo et al., 2020).

La OP, es la enfermedad ósea metabólica crónica más prevalente, y se caracteriza por la disminución de la masa ósea, deterioro de la microarquitectura y aumento de la fragilidad ósea, con los consiguientes aumentos en el riesgo de fractura (Yu et al., 2021). La pérdida ósea resulta de un desequilibrio en la remodelación ósea (Song et al., 2023).

El abordaje terapéutico de la OP es multidisciplinar, y su objetivo principal es prevenir fracturas óseas. Aunque existen muchos métodos preventivos y tratamientos para la pérdida ósea, su aplicación requiere esfuerzo por parte de los pacientes, además de los posibles efectos secundarios y el alto coste de estos medicamentos. Debido a esto, en los últimos años se ha generado el interés del uso de otras estrategias terapéuticas, entre las que cabe destacar la terapia nutricional y el uso de nutraceuticos.

En base a la actividad antiinflamatoria y antioxidante del OLE, puesta de manifiesto en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*, se plantea llevar a cabo un desarrollo experimental cuyo objetivo principal es llegar al conocimiento del funcionalismo de este secoiridoide en un modelo de osteoclastogénesis inducida por M-CSF y RANKL a partir de células de médula ósea de ratón y dilucidar los posibles mecanismos moleculares involucrados.

METODOLOGÍA

I. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Ratones CD1 hembra (20–30 g) fueron proporcionados por el Centro de Producción Animal de la Universidad de Sevilla (Sevilla, España). Los ratones (de 8 a 10 semanas de edad) se distribuyeron aleatoriamente en jaulas y se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura (20 a 25 °C) y humedad (40 a 60 %), un ciclo de luz/oscuridad de 12 h y un estándar ad libitum comida para roedores (PanlabA04, Panlab®, Sevilla, España) y libre acceso al agua.

Todos los experimentos se realizaron en el Animalario de la Facultad de Farmacia (Universidad de Sevilla, España) de acuerdo con las Directrices de la Unión Europea sobre experimentación animal (Directiva del Consejo Europeo 2012/707/EU) y siguiendo un protocolo aprobado por el Comité Ético de la Universidad de Sevilla y por la Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo (Junta de Andalucía, 03/05/2018/071), según el RD 53/1 de febrero de 2013.

Toda la manipulación de los animales, hasta la extracción de la médula ósea, la realizó la tutora de este trabajo, la Dra. María de los Ángeles Rosillo Ramírez, que posee el Certificado de Capacitación, Curso de Formación Continua en Protección y Experimentación Animal. Función A, B y C en Roedores, Lagomorfos, Peces y Anfibios, concedido por la Junta de Andalucía.

II. EXTRACCIÓN DE LA MÉDULA ÓSEA Y DIFERENCIACIÓN A OSTEOCLASTOS

Para la diferenciación de células de la médula ósea de ratón a osteoclastos se siguió el método descrito por Dai et al., 2018.

Los ratones se sacrificaron y se les extrajo la tibia y el fémur de las patas traseras, de las cuales se obtuvo la médula ósea por centrifugación.

La médula ósea, se resuspendió en medio α -MEM (suplementado con L-glutamina, penicilina-estreptomicina 1%, suero fetal bovino al 10%) y se hizo pasar por un filtro de nylon de 70 μ m y se procedió al lisado de los eritrocitos utilizando tampón de lisis de eritrocitos (GIBCO®). Una vez lisados los eritrocitos, el pellet celular se resuspendió en medio α -MEM y se incubó toda la noche a 37°C y 5% CO₂.

Al día siguiente, se recogió el sobrenadante (células en suspensión), se contaron y se preparó una suspensión celular de 5×10^5 células/mL. Estas células no adherentes aisladas, se cultivaron en presencia de M-CSF (10 ng/mL) durante 3 días, dando lugar a macrófagos de la médula ósea (BMMs).

Los BMMs fueron cultivados con M-CSF y RANKL (20 ng/mL) e incubadas en presencia o ausencia de OLE (25, 50 y 100 μ M) durante 4 días. El medio con los diferenciadores y los tratamientos se refrescó cada dos días.

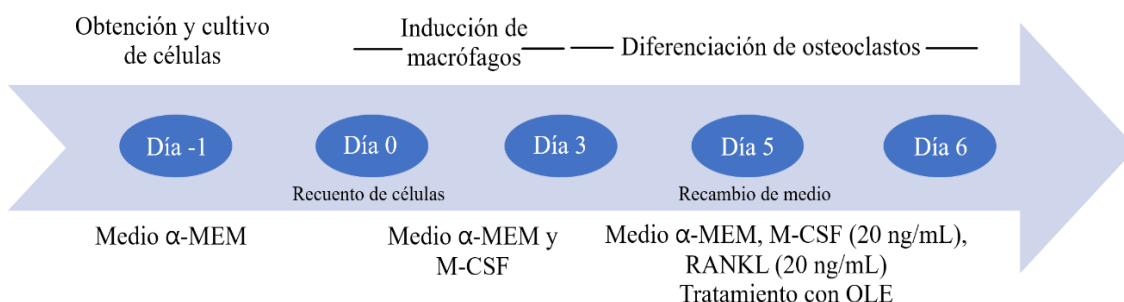


Figura 5. Esquema del proceso de obtención de osteoclastos a partir de células de médula ósea de hembras de ratón CD1, control (sin tratamiento) y tratamientos con OLE a las dosis estudiadas (25, 50 y 100 μ M).

III. VIABILIDAD CELULAR (SRB)

Los BMMs, procedentes de las células de la médula ósea tratadas con M-CSF y sembradas en placas de 96 pocillos (2.5×10^3 células/pocillo) se incubaron en presencia o ausencia de OLE o con él (25, 50, 100 y 200 μ M) durante 24h. El efecto del OLE en la viabilidad celular se realizó a través del ensayo de sulfurodamina B (SRB) (Skehan et al., 1990). Tras la incubación se añadió 50 mL de ácido tricloroacético 50% p/v para fijar las células adherentes a la placa y se incubó 60 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante, lavó con agua destilada cinco veces y secó al aire. Para la tinción de las células se agregó

a cada pocillo 50 μ L de la solución SRB 0,4% p/v disuelta en ácido acético 1%. Luego se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación se repite el proceso anterior de lavado y secado utilizando ácido acético 1%. Para medir la absorbancia se añade a cada pocillo 100 μ L de solución Tris base 100 mM con pH 10,5 y se midió la absorbancia a 510 nm.

El 100% de viabilidad celular se asignó a la absorbancia de las células control (sin tratar) y se calculó el porcentaje de viabilidad de las células tratadas con las distintas concentraciones de OLE comparando sus absorbancias con las del control.

IV. TINCIÓN Y ACTIVIDAD TRAP

Para realizar la tinción y actividad TRAP se utilizaron las células obtenidas el día 6 (figura 5), sembradas en placas de 96 pocillos ($2,5 \times 10^4$ células/pocillo).

- Tinción TRAP

La tinción de TRAP se realizó utilizando un kit de leucocitos de fosfatasa ácida (Sigma-Aldric®).

Se aspiró el medio presente en los pocillos y lavó con PBS 1x, repitiendo el proceso 3 veces.

Para fijar las células se añadió 100 μ L de Fix solution (acetona, solución de citrato y formaldehído 37%) por pocillo. Tras 30 segundos se aspiró y lavó 3 veces con agua Milli-Q a 37°C.

Para la tinción se añadió 100 μ L de TRAP staining solution por pocillo e incubó 30 minutos a 37°C protegido de la luz. Se aspiró y lavó 3 veces con agua Milli-Q. Las células multinucleadas positivas para TRAP que contenían más de tres núcleos se calificaron como osteoclastos y se examinaron con un microscopio Olympus (40x) (Modelo IX71, Olympus, Center Valley, PA, EE. UU.).

- Actividad TRAP

La actividad TRAP se determinó utilizando un kit de ensayo TRAP (Takara Bio®).

Se mezclaron 50 μ L de extracto celular y 50 μ L de p-nitro-fenil fosfato (pNPP) con una solución de tartrato de sodio y se incubaron a 37 °C durante 25 min. La reacción se detuvo con NaOH 0,5 N y se midió la absorbancia a 405 nm.

V. DETERMINACIÓN DE CITOCINAS

Las células no adherentes aisladas de la médula ósea se sembraron en placas de 24 pocillos ($2,5 \times 10^4$ células/pocillo), se cultivaron en presencia de M-CSF (10 ng/mL) durante 3 días, dando lugar a BMMs. Estos macrófagos, fueron tratados con M-CSF y RANKL (20 ng/mL) e incubadas en presencia o ausencia de OLE (25, 50 y 100 μ M) durante 4 días. Los sobrenadantes del cultivo fueron recogidos y conservados a -80 °C.

Se utilizó el enzoinmunoanálisis (ELISA) competitivo utilizando el kit comercial de eBioscience® y siguiendo su protocolo para determinar la cantidad de IL-6 y TNF- α . El método se basa en la competición entre una citocina estándar y la IL-6 y TNF- α por un anticuerpo (Ac) policlonal anti-TNF- α o anti-IL-6 presente en el recubrimiento de la placa. Después de incubar, se añadió un Ac monoclonal que se une al Ac anterior y está ligado a la enzima de detección, la catalasa. Tras lavar y adicionar el sustrato se produjo la reacción enzimática coloreada, midiéndose la intensidad a 450 nm y relacionándose directamente la absorbancia con la concentración de cada citocina en las muestras.

VI. EXPRESIÓN GÉNICA

Los BMMs se incubaron en presencia o ausencia de OLE (25, 50 y 100 μ M) y fueron tratados con M-CSF y RANKL (20 ng/mL) durante 4 días. Pasado el tiempo de tratamiento, el ARN de las células se extrajo utilizando TRIsure™ (Bioline®) y las columnas del kit comercial Quick-RNA™ Microprep Kit (Zymo Research®). La concentración de ARN de las muestras se determinó mediante la relación A260/A280 en un espectrofotómetro NanoDrop™. 1 μ g de ARN, se sometió transcripción inversa mediante el kit de retrotranscripción iScript RT Supermix (Bio-Rad®), en un termociclador T100™ (Bio-Rad®).

Este ADNc obtenido, se utilizó para las amplificaciones por PCR en tiempo real. Los niveles de ARNm para genes específicos se determinaron en un sistema CFX96 (Bio-Rad®) siguiendo el siguiente protocolo: 1 ciclo de activación (95°C, 2 minutos), 40 ciclos de desnaturalización (95°C, 5 segundos), 40 ciclos de unión al cebador/extensión de cadenas (60°C, 30 segundos) y 1 ciclo de curva de fusión (65-95°C en incrementos de medio grado, 5 segundos/ incremento).

Para cada reacción de PCR, al ADNc se le agregó SYBR green QPCR Super-mix (Bio-Rad®) que contenía los pares de cebadores del gen a determinar: TRAP, MMP-9, CTSK y NFATc1; β -actina se utilizó como gen de referencia.

Todas las reacciones de amplificación se realizaron por duplicado y se usaron los números de ciclo de umbral (Ct) promedio de los duplicados para calcular la expresión relativa de ARNm de los genes candidatos. El cambio en la expresión de ARNm para los genes seleccionados se calculó utilizando el método estándar $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$. Todos los datos se normalizaron al contenido del gen de referencia endógena (β -actina) y se expresaron como cambio relativo del control.

VII. ESTUDIO ESTADÍSTICO

Los valores que aparecen tanto en las figuras como en el texto fueron expresados como la media aritmética \pm el error estándar de la media.

Las diferencias significativas entre grupos se evaluaron mediante el test BMSC ANOVA, utilizando el test de comparación múltiple de Tukey. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos. Los datos fueron evaluados con Graph Pad Prism® versión 5.01 software (San Diego, CA, EE. UU.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La implicación de la actividad osteoclastogénica exacerbada en patologías óseas está bien documentada (Gai et al., 2022; Hienz et al., 2015; Pietschmann et al., 2022; Rabjohns et al., 2021). Por ello, la búsqueda de nuevas moléculas para normalizar esta actividad y con ello reducir la sintomatología y frenar la progresión de enfermedades como la OP es esencial para la mejora en la calidad de vida de estos pacientes. Diseñamos este estudio para investigar si OLE tenía algún papel en la regulación de la actividad transcripcional de genes relacionados con la diferenciación y la función de los osteoclastos derivados de BMMs murinos tratados con M-CSF/RANKL, ya que estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación habían puesto de manifiesto el potencial antiinflamatorio y antiartrítico de OLE (Montoya et al., 2021). Sin embargo, hasta la fecha no se conoce el potencial antiosteoclastogénico de OLE en células de la médula ósea estimuladas con M-CSF/RANKL.

I. EFECTO DEL OLEOCANTAL EN LA VIABILIDAD CELULAR

Para determinar el efecto de OLE sobre la viabilidad de los BMMs murinos se utilizó el método SRB. Los resultados muestran que, a excepción del tratamiento con la concentración de 200 μM , las concentraciones utilizadas de OLE para este estudio (25, 50 y 100 μM) no resultaron tóxicas, ya que todos los valores de viabilidad celular se encuentran por encima del 80% (Figura 6).

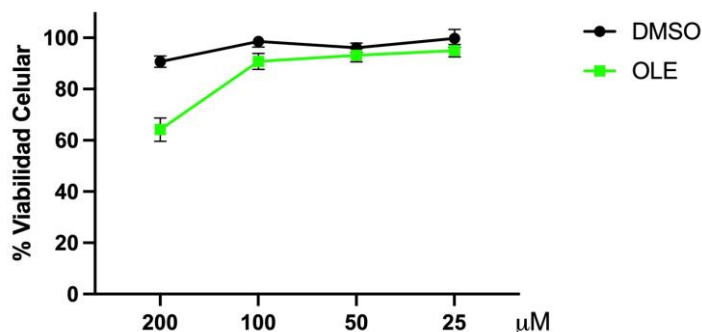


Figura 6. Efecto de OLE en la viabilidad celular en células tratadas con M-CSF. Las concentraciones utilizadas en este estudio no afectan a la viabilidad de los BMMs murinos. Las células fueron tratadas con

OLE (25-200 μM) durante 24h. Resultados expresados en porcentaje de viabilidad celular respecto a las células control (células sin tratamiento).

II. TINCIÓN Y ACTIVIDAD TRAP

El tejido óseo muestra una expresión alta de enzima TRAP, siendo principalmente exhibido por parte de pOC y osteoclastos multinucleados, ya que la enzima TRAP de estas células participa en la degradación de matriz ósea. Actualmente se utiliza como biomarcador, tanto para la identificación histoquímica de osteoclastos como marcador sérico de la actividad de los osteoclastos y el recambio óseo (Igarashi et al., 2002).

Para determinar la implicación de OLE sobre la osteoclastogénesis, los BMMs se estimularon con M-CSF/RANKL en presencia de las diferentes concentraciones de OLE (25, 50 y 100 μM) durante 4 días; las células multinucleadas teñidas con más de tres núcleos se consideraron TRAP-positivas. Los resultados mostraron que OLE inhibió la formación de osteoclastos inducida por M-CSF/RANKL en los BMMs.

Como se muestra en la figura 7, en el grupo control, el tratamiento con M-CSF/RANKL generó numerosos osteoclastos multinucleados positivos en TRAP. Sin embargo, las distintas concentraciones de OLE redujeron eficazmente el número de células multinucleadas positivas para TRAP, observándose en las células tratadas con la concentración más alta (100 μM) la mayor inhibición.

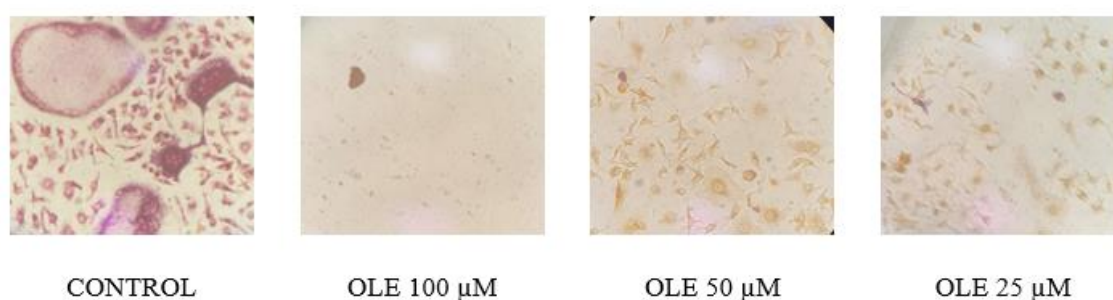


Figura 7. Fotografías representativas de células examinadas mediante tinción TRAP. BMMs estimulados con M-CSF/RANKL en presencia o ausencia de OLE (25, 50 y 100 μM) durante 4 días.

Imágenes tomadas en microscopio óptico 40x.

La actividad enzimática de TRAP se obtiene mediante un método colorimétrico que posteriormente se cuantifica relacionando la intensidad del color con la absorbancia a 405 nm. El grupo control muestra un aumento en la actividad de la enzima TRAP en los osteoclastos maduros sin tratar, mientras que en las células tratadas con OLE se observó una disminución de dicha actividad (figura 8).

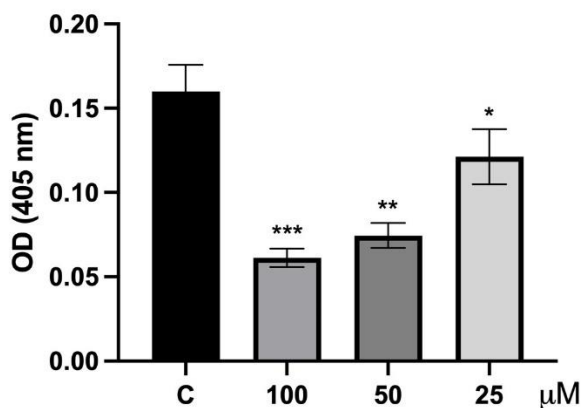


Figura 8. Actividad TRAP en osteoclastos. Actividad enzimática de TRAP representada en absorbancia a 405 nm. Disminución de la actividad enzimática conforme aumenta la dosis del tratamiento y respecto a los datos control. Datos expresados en media \pm error estándar de la media (SEM) (n=6). * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ respecto a células control sin tratamiento.

Los resultados obtenidos tras la tinción y la medida de la actividad TRAP muestran la propiedad antiosteoclastogénica de OLE, al reducir el número de células multinucleadas TRAP-positivas, así como inhibir la actividad de dicha enzima.

III. INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO CON OLEOCANTAL EN LA EXPRESIÓN DE LAS CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS IL-6 Y TNF- α

La IL-6 está involucrada en procesos inflamatorios y su producción en las células del estroma de la médula ósea desencadena la estimulación de RANKL (Jang et al., 2021), cuya presencia promueve la diferenciación de los osteoclastos, contribuyendo al proceso de degradación ósea.

El TNF- α es principalmente sintetizado por macrófagos y linfocitos T (Bradley, 2008), por lo que está involucrado en diversos procesos inflamatorios y relacionados con la respuesta inmunitaria. En concreto, a través del receptor TNFR1 desencadena una de

sus vías de señalización que desemboca en la activación del factor NF- κ B y las MAPK, lo que induce inflamación y también proliferación y supervivencia celular (Jang et al., 2021).

Esta citoquina está relacionada con enfermedades como la AR o la espondiloartritis anquilosante en las que se produce destrucción de tejidos entre los cuales está el hueso (Bradley, 2008).

Como puede observarse en la figura 9 (A) la producción de IL-6 se vio aumentada en las células del grupo control, tras el tratamiento con M-CSF/RANKL. Sin embargo, en los osteoclastos tratados con las concentraciones de 50 y 100 μ M se produjo una reducción significativa de los niveles de dicha citocina. Por el contrario, en las células tratadas con la concentración de 25 μ M no se observaron diferencias significativas en los niveles de IL-6.

Del mismo modo, el tratamiento con M-CSF/RANKL indujo un incremento de los niveles de TNF- α en las células control, pero el tratamiento con el secoiridoide a las concentraciones de 50 y 100 μ M fue capaz de reducir significativamente dichos niveles (figura 9B) en comparación con el grupo control.

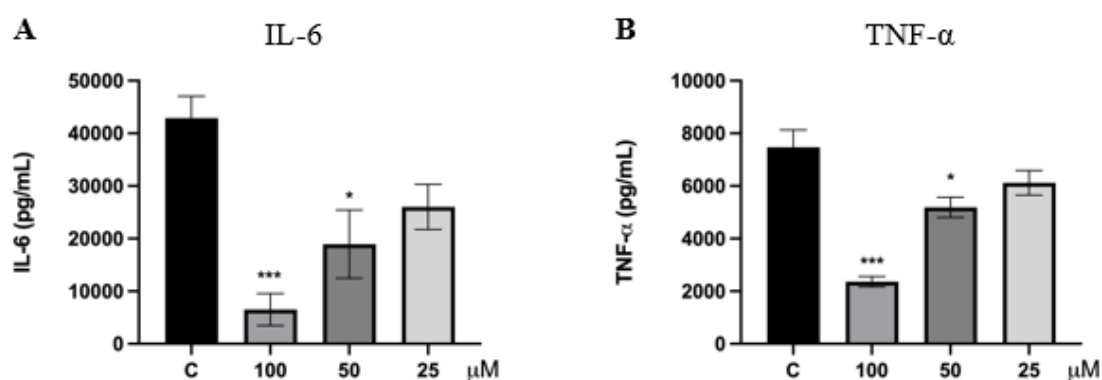


Figura 9. Niveles de las citoquinas IL-6 y TNF- α en osteoclastos murinos. Las gráficas A y B muestran los niveles de citoquinas, en BMMs estimulados con M-CSF/RANKL en presencia o ausencia de OLE (25, 50 y 100 μ M) durante 4 días. Los resultados han sido obtenidos mediante ensayo ELISA y medición de la absorbancia a 450 nm. Datos expresados en media \pm SEM (n=6). ***p<0,001 y *p<0,05 respecto a células control sin tratamiento.

La disminución de los niveles de estas citoquinas en las células tratadas con OLE se encuentra en concordancia con los resultados obtenidos por otros autores, donde OLE

fue capaz de inhibir la producción de dichas citocinas en un cultivo primario de condrocitos aislados de pacientes con osteoartritis estimulados con LPS (Scotece et al., 2018). En otro estudio reciente, se ha demostrado que el tratamiento dietético con OLE redujo de forma significativa los niveles de IL-6 y TNF- α en las patas de ratones, en un modelo murino de AR inducida por colágeno tipo II (Montoya et al., 2021).

IV. EFECTO DEL OLEOCANTAL EN LA EXPRESIÓN DE GENES

NFATc1 es un factor transcripcional clave en la osteoclastogénesis y regula la expresión de varios genes asociados con la diferenciación de los osteoclastos, como TRAP, MMP-9 y CTSK, entre otros (Chen et al., 2018).

Para determinar el papel de OLE en la diferenciación de osteoclastos, estudiamos su efecto sobre la expresión de genes marcadores de los osteoclastos, incluidos NFATc1, TRAP, MMP-9 y CTSK, en BMMs estimulados con M-CSF/RANKL durante 4 días.

Como se indica en la figura 10, el estímulo con M-CSF/RANKL indujo en gran medida la expresión de NFATc1, TRAP, MMP-9 y CTSK en los osteoclastos. Por el contrario, el tratamiento de estas células con las distintas concentraciones de OLE redujo de forma significativa la expresión de estos genes.

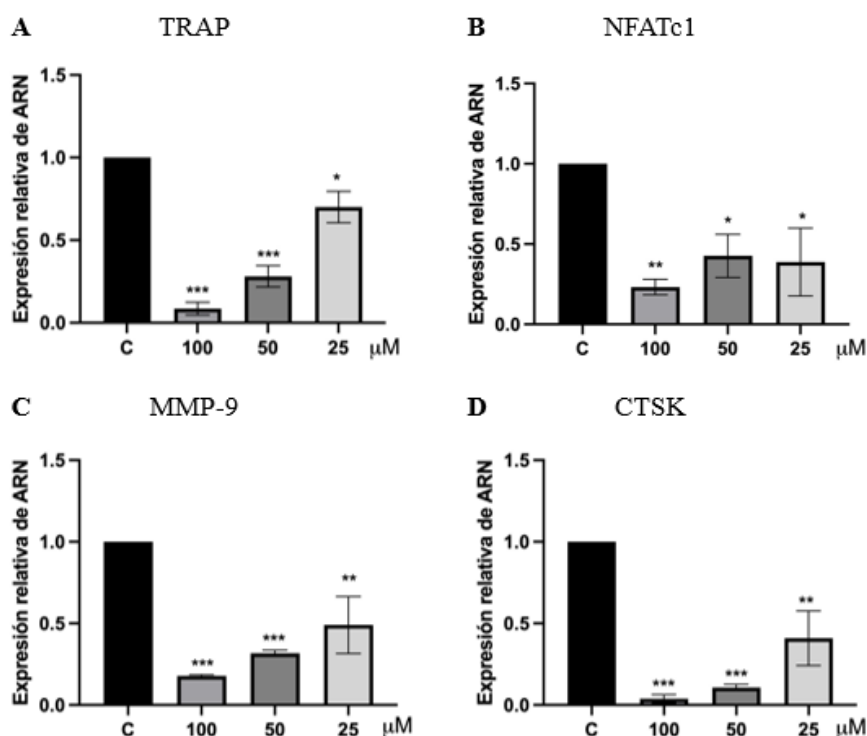


Figura 10. Expresión de genes marcadores de osteoclastos. Las gráficas A, B, C y D representan la expresión de los genes TRAP, NFATc1, MMP-9 y CTSK respectivamente en osteoclastos maduros tras la estimulación con M-CSF y RANKL en presencia o ausencia de OLE (25, 50 y 100 μM) durante 4 días. La expresión se midió mediante qPCR, utilizando como gen constitutivo el gen de la β-actina. Datos expresados en media ± error estándar (n=6). ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05 respecto a células control sin tratamiento.

Estudios previos han demostrado que la sobreexpresión de NFATc1 en precursores de osteoclastos podría causar una inducción de la formación de osteoclastos (Deng et al., 2023) y la inhibición de NFATc1 podría convertir las células TRAP-positivas en células TRAP-negativas (Chang et al., 2007).

TRAP, MMP-9 y CTSK se expresan de forma abundante en los osteoclastos contribuyendo a la reabsorción ósea de los osteoclastos (Jiao et al., 2023). Estos datos están en concordancia con lo obtenido en nuestro estudio ya que encontramos que el tratamiento con M-CSF y RANKL indujo en gran medida la expresión de NFATc1, TRAP, MMP-9 y CTSK en los osteoclastos.

Sin embargo, OLE inhibió significativamente la expresión de genes marcadores relacionados con la osteoclastogénesis en estas células estimuladas con M-CSF/RANKL, lo que sugiere que OLE podría suprimir la diferenciación de osteoclastos mediante la regulación negativa de la expresión de genes marcadores relacionados con la

osteoclastogénesis. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en estudios previos, donde OLE fue capaz de regular a la baja la expresión de MMP-9 a través de la vía de señalización de STAT3 en una línea celular de melanoma (Gu et al., 2017). Por otro lado, OLE produjo una modulación negativa de MMP-9 en un modelo *in vitro* de fibrosis hepática (Gabbia et al., 2021).

CONCLUSIONES

Los resultados de este Trabajo Fin de Grado permiten concluir que:

- Las concentraciones de OLE utilizadas para este estudio (25, 50 y 100 μM) no afectaron a la viabilidad de los BMMs murinos.
- OLE redujo eficazmente el número de células multinucleadas positivas para TRAP, así como la actividad de dicha enzima.
- El tratamiento con OLE a las concentraciones de 50 y 100 μM redujo de forma significativa los niveles de las citocinas IL-6 y TNF- α .
- Tras el tratamiento con el secoiridoide, se observó una disminución en la expresión genética de los genes marcadores de osteoclastos: NFATc1, TRAP, MMP-9 y CTSK.
- Los resultados obtenidos sugieren que OLE podría formar parte del desarrollo de nuevos tratamientos destinados a tratar patologías óseas que cursan con una exacerbación del proceso osteoclastogénico, debido a sus propiedades inhibitoras en la diferenciación de osteoclastos junto a su capacidad antiinflamatoria.

BIBLIOGRAFÍA

An J, Yang H, Zhang Q, Liu C, Zhao J, Zhang L, et al. Natural products for treatment of osteoporosis: The effects and mechanisms on promoting osteoblast-mediated bone formation. *Life Sci* 2016;147:46–58.

Arbolea L, Castañeda S. Osteoclastos: mucho más que células remodeladoras del hueso. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral* 2014;6:109–21.

Bonnet N, Conway SJ, Ferrari SL. Regulation of beta catenin signaling and parathyroid hormone anabolic effects in bone by the matricellular protein periostin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:15048–53.

Boyle WJ, Scott Simonet W, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;423:337–42.

Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 2008;214:149–60.

Calsolaro V, Edison P. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. *Alzheimer's and Dementia* 2016;12:719–32.

Castejón ML, Montoya T, Alarcón-de-la-lastra C, Sánchez-hidalgo M. Potential Protective Role Exerted by Secoiridoids from *Olea europaea* L. in Cancer, Cardiovascular, Neurodegenerative, Aging-Related, and Immunoinflammatory Diseases. *Antioxidants (Basel)* 2020;9.

Chang EJ, Kim Hyon Jong, Ha J, Kim Hyung Joon, Ryu J, Park KH, et al. Hyaluronan inhibits osteoclast differentiation via Toll-like receptor 4. *J Cell Sci* 2007;120:166–76.

Chen F, Xie L, Kang R, Deng R, Xi Z, Sun D, et al. Gentiopicroside inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis by regulating NF- κ B and JNK signaling pathways. *Biomed Pharmacother* 2018;100:142–6.

Chin KY, Ima-Nirwana S. Olives and Bone: A Green Osteoporosis Prevention Option. *Int J Environ Res Public Health* 2016;13.

Chiu YH, Ritchlin CT. DC-STAMP: A Key Regulator in Osteoclast Differentiation. *J Cell Physiol* 2016;231:2402.

Dai Q, Han Y, Xie F, Ma X, Xu Z, Liu X, et al. A RANKL-based Osteoclast Culture Assay of Mouse Bone Marrow to Investigate the Role of mTORC1 in Osteoclast Formation. *J Vis Exp* 2018;2018.

Deng M, Luo J, Cao H, Li Y, Chen L, Liu G. METTL14 represses osteoclast formation to ameliorate osteoporosis via enhancing GPX4 mRNA stability. *Environ Toxicol* 2023.

Dinda B, Dinda M, Kulsi G, Chakraborty A, Dinda S. Therapeutic potentials of plant iridoids in Alzheimer's and Parkinson's diseases: A review. *Eur J Med Chem* 2019;169:185–99.

Ding M, Cho E, Chen Z, Park SW, Lee TH. (S)-2-(Cyclobutylamino)-N-(3-(3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)-2-hydroxypropyl)isonicotinamide Attenuates RANKL-Induced Osteoclast Differentiation by Inhibiting NF- κ B Nuclear Translocation. *Int J Mol Sci* 2023;24.

Elnagar AY, Sylvester PW, El Sayed KA. (-)-Oleocanthal as a c-Met inhibitor for the control of metastatic breast and prostate cancers. *Planta Med* 2011;77:1013–9.

Fernando Mikán J V, William Darío Oliveros YA. OSTEOCLASTOGÉNESIS Y ENFERMEDADES ÓSEAS. vol. 15. 2007.

Francisco V, Ruiz-Fernández C, Lahera V, Lago F, Pino J, Skaltsounis L, et al. Natural Molecules for Healthy Lifestyles: Oleocanthal from Extra Virgin Olive Oil. *J Agric Food Chem* 2019;67:3845–53.

Gabbia D, Carpi S, Sarcognato S, Cannella L, Colognesi M, Scaffidi M, et al. The Extra Virgin Olive Oil Polyphenol Oleocanthal Exerts Antifibrotic Effects in the Liver. *Front Nutr* 2021;8.

Gai D, Chen JR, Stewart JP, Nookaew I, Habelhah H, Ashby C, et al. CST6 suppresses osteolytic bone disease in multiple myeloma by blocking osteoclast differentiation. *J Clin Invest* 2022;132.

Geromichalou EG, Geromichalos GD. In Silico Approach for the Evaluation of the Potential Antiviral Activity of Extra Virgin Olive Oil (EVOO) Bioactive Constituents Oleuropein and Oleocanthal on Spike Therapeutic Drug Target of SARS-CoV-2. *Molecules* 2022;27.

- Grewal R, Reutzel M, Dilberger B, Hein H, Zotzel J, Marx S, et al. Purified oleocanthal and ligstroside protect against mitochondrial dysfunction in models of early Alzheimer's disease and brain ageing. *Exp Neurol* 2020;328:113248.
- Gu Y, Wang J, Peng L. (-)-Oleocanthal exerts anti-melanoma activities and inhibits STAT3 signaling pathway. *Oncol Rep* 2017;37:483–91.
- El Haouari M, Quintero JE, Rosado JA. Anticancer molecular mechanisms of oleocanthal. *Phytother Res* 2020;34:2820–34.
- Hienz SA, Paliwal S, Ivanovski S. Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis. *J Immunol Res* 2015;2015.
- Iacono A, Gómez R, Sperry J, Conde J, Bianco G, Meli R, et al. Effect of oleocanthal and its derivatives on inflammatory response induced by lipopolysaccharide in a murine chondrocyte cell line. *Arthritis Rheum* 2010;62:1675–82.
- Iantomasi T, Romagnoli C, Palmini G, Donati S, Falsetti I, Miglietta F, et al. Oxidative Stress and Inflammation in Osteoporosis: Molecular Mechanisms Involved and the Relationship with microRNAs. *Int J Mol Sci* 2023;24.
- Igarashi Y, Lee MY, Matsuzaki S. Acid phosphatases as markers of bone metabolism. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002;781:345–58.
- Jang DI, Lee AH, Shin HY, Song HR, Park JH, Kang TB, et al. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics. *Int J Mol Sci* 2021;22:1–16.
- Jiao Z, Chai H, Wang S, Sun C, Huang Q, Xu W. SOST gene suppression stimulates osteocyte Wnt/ β -catenin signaling to prevent bone resorption and attenuates particle-induced osteolysis. *J Mol Med (Berl)* 2023;101:607–20.
- Katsimbri P. The biology of normal bone remodelling. *Eur J Cancer Care (Engl)* 2017;26.
- Kenkre JS, Bassett JHD. The bone remodelling cycle. *Ann Clin Biochem* 2018;55:308–27.
- Khanfar MA, Bardaweel SK, Akl MR, El Sayed KA. Olive Oil-derived Oleocanthal as Potent Inhibitor of Mammalian Target of Rapamycin: Biological Evaluation and Molecular Modeling Studies. *Phytother Res* 2015;29:1776–82.

Kim JH, Kim N. Signaling Pathways in Osteoclast Differentiation. *Chonnam Med J* 2016;52:12.

Lozano-Castellón J, López-Yerena A, Rinaldi de Alvarenga JF, Romero del Castillo-Alba J, Vallverdú-Queralt A, Escribano-Ferrer E, et al. Health-promoting properties of oleocanthal and oleacein: Two secoiridoids from extra-virgin olive oil. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2020;60:2532–48.

Montoya T, Sánchez-Hidalgo M, Castejón ML, Rosillo MÁ, González-Benjumea A, Alarcón-De-la-lastra C. Dietary Oleocanthal Supplementation Prevents Inflammation and Oxidative Stress in Collagen-Induced Arthritis in Mice. *Antioxidants (Basel)* 2021;10.

Montoya T, Sánchez-Hidalgo M, Castejón ML, Vazquez-Román MV, de Sotomayor MA, Ortega-Vidal J, et al. Oleocanthal supplemented diet improves renal damage and endothelial dysfunction in pristane-induced systemic lupus erythematosus in mice. *Food Research International* 2023;163:112140.

Moral R, Escrich E. Influence of Olive Oil and Its Components on Breast Cancer: Molecular Mechanisms. *Molecules* 2022;27.

Pang KL, Chin KY. The Biological Activities of Oleocanthal from a Molecular Perspective. *Nutrients* 2018;10.

Pietschmann P, Butylina M, Kerschman-Schindl K, Sipos W. Mechanisms of Systemic Osteoporosis in Rheumatoid Arthritis. *Int J Mol Sci* 2022;23.

Rabjohns EM, Hurst K, Ghosh A, Cuellar MC, Rampersad RR, Tarrant TK. Paget's Disease of Bone: Osteoimmunology and Osteoclast Pathology. *Curr Allergy Asthma Rep* 2021;21.

Riancho JA, Delgado-Calle J. Mecanismos de interacción osteoblasto-osteoclasto. *Reumatol Clin* 2011;7:1–4.

Robling AG, Bonewald LF. The Osteocyte: New Insights. *Annu Rev Physiol* 2020.

Romani A, Ieri F, Urciuoli S, Noce A, Marrone G, Nediani C, et al. Health Effects of Phenolic Compounds Found in Extra-Virgin Olive Oil, By-Products, and Leaf of *Olea europaea* L. *Nutrients* 2019, Vol 11, Page 1776 2019;11:1776.

Rosillo MA, Montserrat-De-La-Paz S, Abia R, Castejon ML, Millan-Linares MC, Alarcon-De-La-Lastra C, et al. Oleuropein and its peracetylated derivative negatively regulate osteoclastogenesis by controlling the expression of genes involved in osteoclast differentiation and function. *Food Funct* 2020;11:4038–48.

Scotece M, Conde J, Abella V, López V, Francisco V, Ruiz C, et al. Oleocanthal Inhibits Catabolic and Inflammatory Mediators in LPS-Activated Human Primary Osteoarthritis (OA) Chondrocytes Through MAPKs/NF- κ B Pathways. *Cell Physiol Biochem* 2018;49:2414–26.

Segura-Carretero A, Curiel JA. Current Disease-Targets for Oleocanthal as Promising Natural Therapeutic Agent. *Int J Mol Sci* 2018;19.

Siddique AB, Ebrahim HY, Akl MR, Ayoub NM, Goda AA, Mohyeldin MM, et al. (–)-Oleocanthal Combined with Lapatinib Treatment Synergized against HER-2 Positive Breast Cancer In Vitro and In Vivo. *Nutrients* 2019;11:412.

Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 1990;82:1107–12.

Søe K, Delaisse JM, Borggaard XG. Osteoclast formation at the bone marrow/bone surface interface: Importance of structural elements, matrix, and intercellular communication. *Semin Cell Dev Biol* 2021;112:8–15.

Song W, Sheng Q, Bai Y, Li Li, Ning X, Liu Y, et al. Obesity, but not high-fat diet, is associated with bone loss that is reversed via CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs-mediated gut microbiome of non-obese mice. *NPJ Sci Food* 2023;7:14.

Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of Osteoclast Differentiation and Function by the New Members of the Tumor Necrosis Factor Receptor and Ligand Families. *Endocr Rev* 1999;20:345–57.

Tripoli E, Giammanco M, Tabacchi G, Di Majo D, Giammanco S, La Guardia M. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutr Res Rev* 2005;18:98–112.

Yavropoulou M.P., Yovos J.G. Osteoclastogenesis - Current knowledge and future perspectives. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2008;8:204–16.

Yu W, Zhong L, Yao L, Wei Y, Gui T, Li Z, et al. Bone marrow adipogenic lineage precursors promote osteoclastogenesis in bone remodeling and pathologic bone loss. *J Clin Invest* 2021;131.

Zhang J, Mo L, Huang H, Xu J, Fan Y, Li W, et al. Loureirin B downregulates osteoclast differentiation of bone marrow macrophages by targeting the MAPK signaling pathway. *Sci Rep* 2022;12.

Zhou B, Peng K, Wang G, Chen W, Kang Y. Polo Like Kinase 4 (PLK4) impairs human bone marrow mesenchymal stem cell (BMSC) viability and osteogenic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2021;549:221–8.