

Efectos del lipopolisacárido

En cultivos de osteoblastos murinos *in vitro* sobre la producción de RANKL

Karina Soto Martínez, Rosina Villanueva A.
y Salvador García-López*

Las citocinas proinflamatorias tales como IL-1 β , TNF- α e IL-6, entre otras, se encuentran en concentraciones elevadas en enfermedades como la periodontitis, la artritis y la osteoporosis,¹ que conllevan a una interacción del osteoblasto y osteoclasto, induciendo la resorción ósea en los tejidos adyacentes afectados. Descubrimientos recientes han demostrado que aplicar carga mecánica sobre el hueso induce estas citocinas proinflamatorias en el osteoblasto, regulando la actividad osteoclástica mediante el factor ligando de transcripción κ B (RANKL),² el cual se libera de la superficie del osteoblasto para unirse a la receptora de los osteoclastos precursores o células maduras denominado factor receptor activador de transcripción κ B o RANK, el cual induce a la diferenciación de osteoclastos precursores, la diferenciación osteoclástica y la activación de osteoclastos maduros, contribuyendo en el proceso resorción ósea.³ Para contrarrestar tal efecto, el osteoblasto produce un decodificador natural llamado osteoprotegerina (OPG),⁴ el cual inhibe el proceso de resorción ósea.

Por otra parte, se ha demostrado que la presencia de bacterias gram negativas presentes en la periodontitis activan linfocitos T, debido a la presencia de lipopolisacárido (LPS) que se encuentra en la pared celular, el cual induce una sobre regulación de RANKL por la presencia de citocinas proinflamatorias en el surco gingival,⁵ induciendo diferenciación osteoclástica que culmina con la pérdida ósea.

El propósito del presente proyecto fue de evaluar si los osteoblastos cultivados *in vitro* pueden inducir la sobre regulación de RANKL con la adición de 1 μ g/ml de lipopolisacárido.

Material y método

Diseño del estudio

El presente estudio fue experimental.

Químicos y reactivos

La recombinante murina y anticuerpos del RANKL se obtuvieron de la compañía Peprotech (Estados Unidos). Medios de cultivo, antibióticos, suero fetal de ternera y tripsina EDTA se obtuvieron de la compañía Gibco (Grand

Island, N.Y). Los ratones hembras recién nacidas Balb/c se obtuvieron del bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco (UAM-Xochimilco), los cuales se sacrificaron de acuerdo con las guías de investigación aprobadas por el comité ético de la Universidad Autónoma Metropolitana.

Cultivos primarios de osteoblastos murinos

Los osteoblastos murinos fueron preparados y caracterizados por la modificación de un método previamente descrito por Heath et al.⁶ Al cráneo de 10 ratones hembras recién nacidas (1-2 días) les fueron extraídos los huesos frontales y parietales, estos fueron removidos asépticamente y se eliminó el tejido adherente como piel, músculo y tejido nervioso. Los huesos fueron expuestos a digestión enzimática por medio de tripsina EDTA (10 mg/ml (Gibco, USA), los osteoblastos desprendidos de la primera digestión enzimática a los 20 minutos y una segunda digestión enzimática a los 40 minutos fueron eliminados. Los huesos del cráneo restante fueron lavados en solución buffer de fosfatos (PBS) y cortados en pedazos con un bisturí antes de una tercera digestión enzimática durante otros 20 minutos. El medio fue centrifugado a 1000rpm durante cinco minutos, los osteoblastos obtenidos se contaron en una cámara de New Vawer y se ajustaron a 1 x10³ en 1ml para ser resuspendidos en cajas petri de 20 pozos de 1.5mm en un medio de cultivo F-12 Dulbecco, modificado (Ham's F12-Dulbecco's modified Eagles's medium -DMEM) con 10% de suero fetal bovino (FCS Giberfan), 100U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomina y 0.25 μ g/ml de anfotericina, creciendo las células a 37°C en una atmósfera humidificada de 95% de aire y 5% de CO₂. El medio de cultivo fue reemplazado cada 48 o 72 horas, dependiendo del cambio de pH que se presentó.

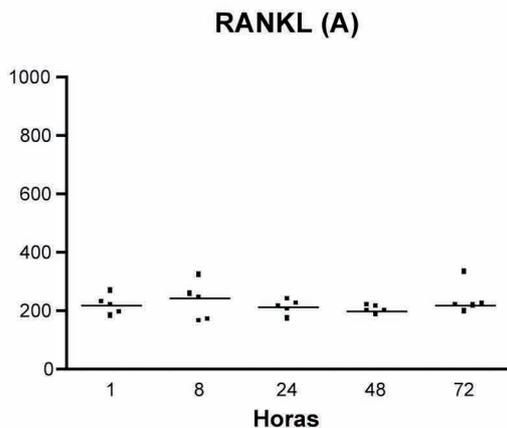
Estimulación de osteoblastos murinos cultivados *in vitro* con LPS

Los osteoblastos murinos fueron estimulados con 1 μ g/ml de LPS al inicio del estudio (n=5), el grupo control no fue estimulado (n=5). Tanto el grupo control como el grupo experimental se incubaron en una atmósfera de CO₂ en 5 y 95 por ciento de aire. Los cultivos fueron aleatoriamente colocados tanto controles como experimentales y fueron incubados secuencialmente en el mismo lugar.

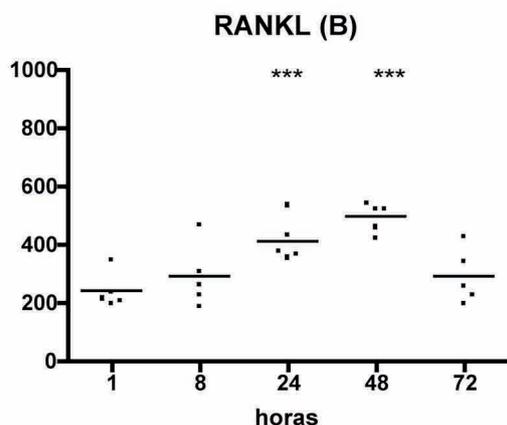
Ensayo para determinación de RANKL

El sobrenadante fue recolectado durante las 1, 8, 24, 48, y 76 horas de cultivo y centrifugado a 1000rpm para remover cualquier partícula extraña. El sobrenadante fue almacenado a -70°C. para poder determinar la producción

* Licenciada en Estomatología, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco; profesora titular de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco <sgarcia@correo.xoc.uam.mx>, y profesor invitado al Departamento de Ortodoncia del Hospital General Dr. Manuel Gea González, respectivamente.



Gráfica 1. Producción de RANKL en cultivos de monocapas de osteoblastos murinos del grupo control (A) y estimulados con lipopolisacárido (B).



Gráficas 2. Monocapas de cultivos de osteoblastos murinos fueron estimulados con un lipopolisacárido de 1 a 72 horas, comparados con osteoblastos no estimulados. El sobrenadante fue ensayado para RANKL por medio de la prueba de ELISA. La primera gráfica representa el control (osteoblastos no estimulados) y la segunda el experimental (estimulado con lipopolisacárido). Los resultados son expresados en promedio \pm (SEM): (n=10). La prueba de U Mann-Whitney fue utilizada para detectar diferencias significativas. *** ($p < 0.001$) de RANKL en los osteoblastos estimulados con lipopolisacáridos comparados con los no estimulados.

de RANKL por medio de un ensayo de ELISA. (Enzyme-linked immunoassay). A una microplaca con anticuerpos monoclonales específicos para RANKL previamente ya cubierta en los pozos (Peprotech, USA), se les adicionó 200 μ l. de medio del grupo control y del grupo experimental en cada pozo. Los promedios fueron obtenidos por diluciones seriadas de RANKL en diluciones conocidas para producir concentraciones de 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8, 3.9 y 0 pg/ml de cada una en duplicado.

Las muestras controles y experimentales fueron diluidas a la x^5 y x^{10} y probadas en duplicado. Después de incubar durante dos horas a 37°C, las muestras fueron lavadas tres veces con solución buffer (400ml solución salina buffer de fosfato PBS) utilizando una máquina de aspiración (Labsystems). 200 μ l de conjugado se adicionaron e incubaron con una nueva tira suministrada en el Kit de ELISA a temperatura ambiente por más de una hora; después se lavó la microplaca como se mencionó. 200 μ l de solución de sustrato se agregó a cada pozo en un intervalo de cinco segundos e incubado por 20 minutos a temperatura ambiente. Se adicionó 50 μ l de solución de H_2SO_4 para detener la reacción, se midió la absorbancia a 540nm usando un equipo de espectrofotometría (Labsystems). Una curva logarítmica promedio fue dibujada utilizando una computadora y el programa software Genesys (Labsystems) y así se determinó la concentración de RANKL en las muestras de cultivo.

Análisis estadístico

Los resultados son expresados en promedio \pm (SEM): (n=10). La prueba de U Mann Whitney se empleó para detectar diferencias significativas. Los resultados fueron analizados con el programa Prism (USA) para computadora personal.

Resultados

El presente proyecto investigó los efectos de un 1 μ g/ml de lipopolisacárido sobre la producción de RANKL en osteoblastos murinos Balb/c cultivados in vitro en cajas petri de 15mm. Los datos obtenidos se registraron en forma cuantitativa (pg/ml) de acuerdo con el promedio de cada sobrenadante tomado a las 1, 8, 24, 48 y 72 horas, las muestras fueron guardadas a -70°C. Los sobrenadantes fueron analizados por ELISA para determinar los efectos del lipopolisacárido sobre la producción de RANKL. Como parte del análisis de los resultados, se separaron en dos grupos que corresponden al grupo control (n=5, no estimulado) y el experimental (estimulado con lipopolisacárido n=5), aleatoriamente seleccionados en ambos grupos. Se realizó la prueba de U Mann-Whitney, utilizando el paquete estadístico (Prism USA) para uso de computadora personal y distinguir la diferencia significativa entre el grupo control y el grupo experimental.

Los resultados mostraron que los osteoblastos murinos cultivados in vitro sintetizaron en forma constitutiva el RANKL. Sin embargo, el grupo experimental incrementó su producción paulatinamente a partir de las ocho horas, pero presentando diferencia estadísticamente significa-

tiva a las 24 y 48 horas (Gráfica 1 y 2); posteriormente empezó un decremento, llegando a los mismos rangos comparados con el grupo control.

Discusión

Los osteoblastos murinos fueron preparados y caracterizados por la modificación de un método previamente descrito por Heath et al.⁷ Durante el estudio se observó que no hubo diferencia discernible en la forma y orientación de las células entre el grupo control y los cultivos estimulados con lipopolisacáridos.

En estudios previos realizados in vivo en in vitro han demostraron que la producción de PGE2 en osteoblastos, está relacionada en la inducción de la resorción ósea a través de IL-1, TNF- α y de la presencia de LPS.⁸ El LPS, constituyente mayor de las bacterias gram negativas, y ha demostrado ser un potente estimulador en la pérdida ósea en las enfermedades inflamatorias, inclusive durante la enfermedad periodontal.

En este estudio se determinó que 1 μ g/ml de LPS adicionado al medio de cultivo de osteoblastos murinos cultivados in vitro indujo la sobre producción de RANKL de las 24 a las 48 horas, demostrando una diferencia estadísticamente significativa comparada con el grupo control. El receptor activador del factor nuclear kappa B (RANK) y su ligando RANKL son reguladores claves en la formación y función del osteoclasto. El RANKL es expresado por osteoblastos y células del estroma del hueso, induciendo la diferenciación del osteoclasto vía RANK.⁹ En un estudio previo demostramos que los osteoblastos murinos incrementa la síntesis de TNF- α después de aplicar un estímulo mecánico, acompañado de una sobreproducción de IL-1,¹⁰ esto inicia una cascada de eventos, que culmina en la

activación del factor de transcripción NF- κ B y JNK (c-Jun N-terminal cinasa), dado que la IL-1 induce la formación de dos heterodímeros que participan en la activación celular del receptor tipo I de IL-1 (IL-1R1) y la proteína receptora accesoria IL-1RAcP, los que a su vez activan y reclutan a la molécula MyD88 del receptor de IL-1 asociada con las cinasas IRAK (cinasa asociada al receptor de IL-1) y TRAF-6 (factor asociado al receptor de TNF-6).¹¹ La activación de estas moléculas en el osteoblasto induce la sobre regulación de la expresión de RANKL, y al unirse al RANK del osteoclasto, inicia la diferenciación y actividad osteoclástica que conlleva a la resorción ósea. Por tanto, se demostró que adicionar 1 μ g/ml de LPS a los cultivos de osteoblastos murinos, indujo a una sobre regulación de RANKL durante las 24 y 48 horas con respecto el grupo control, dicha observación nos indica que el LPS no sólo induce la resorción ósea activada por los linfocitos T presente en el surco gingival, sino también puede inducir a la activación de los osteoblastos presentes en el hueso alveolar, contribuyendo también a la pérdida ósea durante la enfermedad periodontal.

Conclusiones

El presente estudio demostró que adicionar 1 μ g/ml de LPS a cultivos de osteoblastos murinos incrementó la síntesis de RANKL en forma significativa de las 24 y 48 horas comparado con su grupo control.

Considerando lo anterior, se puede sugerir el desarrollo de un modelo inmunobiológico para contrarrestar la producción de RANKL por la presencia del LPS de las bacterias gram negativas, y de tal manera evitar la resorción ósea mediada a través de este factor de transcripción durante la enfermedad periodontal. 

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SR Goldring, M.B. Goldring y J. Buckwalter, "The Role of Cyt Cartilage Matrix Degeneration in Osteoarthritis", *Clin. Orthop. Rel. Res.* (427 Suppl), 2004;S27 S236, P.Stashenko, "Tissue Levels of Bone Resorptive Cytokines in Periodontal Disease", *J. Periodontol.*, núm. 62, 1991, pp. 504-509, P.Stashenko, "Levels of Interleukin 1 Beta in Tissue From Sites of Active Periodontal Disease", *J. Clin. Periodontol.*, núm. 18, 1991, pp. 548-554 y L.Hofbauer y M. Schoopet, "Clinical Implications of the Osteoprotegerin/RANKL/RANK System for Bone and Vascular Diseases", *JAMA*, núm. 242, 2004, pp. 490-495.
2. S. García-López, R. Villanueva, R. Bojalil, L. Montaña, F.R. Massó y V. Ramírez, "Determinación de la producción de Interleucina-1 β al estímulo mecánico en osteoblastos humanos cultivados in-vitro", *Revista de la Asociación Dental Mexicana*, núm. 3, 2003, pp. 85-89.
3. S.García-López, R. Villanueva, L. Montaña, F.Massó y M. Meikle, "Mechanical Deformation of Murine Osteoblasts Cultivated *In Vitro* Down-regulate RANKL and Up-regulate OPG Production", *Eur. J. Ortho.*, vol. 28, núm. 6, 2006.
4. N.Undawa, N. Takashi, H. Yasuda, et al., "Osteoprotegerin Produced by Osteoblasts is an Important Regulator in Osteoclast Development and Function", *Endocrinology*, núm. 4, 2000, pp. 3478-3484.
5. Y. Gao, F. Grassi, M.N. Ryan et al., "IFN-gamma Stimulates Osteoclast Formation and Bone Loss In Vivo Via Antigen-Driven T Cell Activation", *J. Clin. Invest.*, vol. 117, núm. 1, enero de 2007, pp. 122-132.
6. J. K. Heath, S.J. Atkinson, M.C. Meikle et al., "Mouse Osteoblasts Synthesize Collagenase in Response to Bone Resorbing Agents",

Biochemistry and Biophysic Acta, núm. 802, 1984, pp. 151-154.

7. J. K. Heath, S.J. Atkinson, M.C. Meikle et al., *op. cit.*

8. 10.- S. Sakuma, Y. Kato, M. Suda, et al., "Impaired Bone Resorption by Lipopolysaccharide In Vivo In Mice Deficient in the Prostaglandin E Receptor EP4 Subtype", *Infect. Immun.*, núm. 68, 2000, pp. 6819-6825.

9. H. Yasuda, N. Shima, N. Nakagawa, et al. "Identify of Osteoclastogenesis Inhibitory Factor (OCIF) and Osteoprotegerin (OPG): A Mechanism by Which OPG/OCIF Inhibits Osteoclastogenesis In Vitro", *Endocrinology*, núm. 139, 1998, pp. 1329-1337 y H. Yasuda, N. Shima, N. Nakagawa, et al., "Osteoclast Differentiation Factor is a Ligand for Osteoprotegerin/Osteoclastogenesis-Inhibitory Factor and its Identical to TRANCE/RANKL", *Proc Natl Acad Sci USA*, núm. 95, 1998, pp. 3597-3600.

10. S. García-López, M.C. Meikle, R.E. Villanueva, L. Montaña, F. Massó, V. Ramírez-Amador y R. Bojalil, "Mechanical Deformation Inhibits IL-10 and Stimulates IL-12 Production By Mouse Calvarial Osteoblasts In-Vitro", *Archives of Oral Biology*, vol. 50, núm. 4, 2005, pp. 449-452.

11. 14.- V. Baud, Z. Liu y B. Bennett, "Signaling by Proinflammatory Cytokines: Oligomerization of TRAF" And TRAF6 is Sufficient for JNK And IKK Activation and Target Gene Induction Via an Amino-Terminal Effector Domain", *Genes Development*, núm. 13, 1999, pp. 1297-1308.