

## Revista de la Asociación Dental Mexicana

Volumen  
Volume 60

Número  
Number 3

Mayo-Junio  
May-June 2003

*Artículo:*

Determinación de la producción de  
interleucina-1b al estímulo mecánico en  
osteoblastos humanos cultivados *in*  
*vitro*

Derechos reservados, Copyright © 2003:  
Asociación Dental Mexicana, AC

Otras secciones de  
este sitio:

- 👉 [Índice de este número](#)
- 👉 [Más revistas](#)
- 👉 [Búsqueda](#)

*Others sections in  
this web site:*

- 👉 [Contents of this number](#)
- 👉 [More journals](#)
- 👉 [Search](#)



[Medigraphic.com](http://Medigraphic.com)

# Determinación de la producción de interleucina-1 $\beta$ al estímulo mecánico en osteoblastos humanos cultivados *in vitro*<sup>§</sup>

Salvador García López CD, M, Sc., M. Orth. RCSEd,<sup>\*,\*\*,\*\*\*,\*\*\*\*</sup>  
Rosina E. Villanueva CD, M Sc,<sup>\*</sup>  
Rafael Bojalil Parra MC, D en C,<sup>\*\*\*</sup>  
Luis Felipe Montaña MC, D en C<sup>\*\*</sup>  
Luis Felipe Massó MC, D en C<sup>\*\*</sup>  
Velia Ramírez Amador CD M Sc Ph D<sup>\*,\*\*\*\*</sup>

§ 5º. lugar en el Premio Nacional de Investigación Odontológica de la Fundación Glaxo-Wellcome (2000).

\* Universidad Autónoma Metropolitana.

\*\* Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

\*\*\* Hospital General, Dr. Manuel Gea González.

\*\*\*\* Instituto Nacional de Nutrición.

\*\*\*\*\* Certificado por el Consejo Mexicano de Ortodoncia.

## Resumen

La remodelación mecánica del hueso es utilizada por los ortodontistas, quienes ejercen fuerza sobre los dientes para moverlos a través del hueso alveolar, tal remodelación ósea involucra la activación de las células del hueso y la estimulación de la resorción y aposición de la matriz ósea. La estimulación mecánica ha sido reconocida como un factor importante en la remodelación ósea, especialmente durante la erupción de los dientes, en la corrección de las maloclusiones, sin embargo, los aspectos moleculares que se involucran en estos procesos no han sido totalmente entendidos. Se han desarrollado diferentes métodos para aplicar el estímulo mecánico al tejido óseo *in vivo* o *in vitro* a células humanas para evaluar el resultado bioquímico. El objetivo de este trabajo fue de analizar los efectos de la estimulación mecánica en osteoblastos humanos (Saos-2) cultivados *in vitro* con respecto a la producción de interleucina 1 Beta (IL-1 $\beta$ ), uno de los pasos involucrados en el proceso de remodelación ósea. En este estudio se desarrolló un método de crecer osteoblastos humanos como línea celular en cajas Petri, donde la base puede ser deformada intermitentemente cada 5 segundos después de 1.5 minutos durante más de 72 horas. La estimulación mecánica de estas células es comparada con células no estimuladas ( $n = 5$ ). Los osteoblastos humanos son sembrados para ser confluentes en un medio de cultivo F12 de Dulbecco modificado con un 10% de suero fetal, 100  $\mu\text{g/mL}$  de estreptomycin, 100U/mL de penicilina y 0.25  $\mu\text{g/mL}$  de anfotericina, en una atmósfera de 95% de aire y un 5% de  $\text{CO}_2$  a 37° C. Utilizando el ensayo de ELISA (Enzyme-Linked Immunoassay) se determinó los niveles de producción de IL-1 $\beta$  después de 8, 24, 48 y 72 horas. Los resultados mostraron que no hubo producción de IL-1 $\beta$  a las 8 horas de estímulo, sin embargo a las 24 ( $13.5 \pm 2.1$ ) 48 ( $23.2 \pm 1.3$ ) y 72 horas ( $33.9 \pm 1.9$ ) se encontró una diferencia estadísticamente significativa comparada con el control ( $p < 0.0001$ ). Estos resultados sugieren que los osteoblastos humanos (Saos-2) cultivados *in vitro* reaccionan al estímulo mecánico liberando mayor cantidad de IL-1 $\beta$  en comparación con el control y de alguna manera algunos efectos celulares pueden ser asociados con la remodelación ósea y el movimiento dentario durante el tratamiento de ortodoncia.

**Palabras clave:** Osteoblastos, fuerzas mecánicas, remodelación ósea, tratamiento de ortodoncia, interleucina 1 $\beta$ .

## Abstract

Mechanical bone remodelling is utilized by orthodontists, when forces are exerted on tooth roots that enable to move through alveolar bone. Such remodelling involves the activation of bone cells and the simultaneous breakdown and reformation of the bone matrix. Mechanical forces are applied in the correction of dentofacial discrepancies and dentoalveolar malocclusions during orthodontic tooth movement, nevertheless the cellular mechanism involved in the translation of biomechanics forces into molecular events are poorly understood.

The aim of this study was to assay the effects of mechanical stress in human osteoblasts-like cells (Saos-2) under organ culture condition with respect to Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) production. In this report we have developed a model to deforming osteoblasts in monolayer cultures capable of deformation. We examined the behaviour of Saos-2 cells with respect to cytokine production, when stimulated by a cycle of cell deformation of 5 seconds every 1.5 minutes after 8, 24, 48 and 72 hours. The cellular perturbation in these cells was then compared to underformed cells ( $n = 5$ ). Cells were grown to confluence in Ham's F12/DMEM media which contained 10% foetal calf serum, 100  $\mu$ g/mL streptomycin, 100 U/mL penicillin and 0.25  $\mu$ g/mL amphotericin and grown in tissue culture flask at 37°C. In a humidified atmosphere 95% air – 5% CO<sub>2</sub>. Enzyme-linked immunoassay (ELISA) was used to measure Interleukin-1 $\beta$  production. Results have shown that human clonal osteoblasts do not produce IL-1 $\beta$  at 8 hours nevertheless at 24 hours ( $13.5 \pm 2.1$ ), 48 ( $23.2 \pm 1.3$ ) and 76 hours ( $33.9 \pm 1.9$ ) there is a significantly increased production of IL-1 $\beta$  compared to the control ( $p < 0.0001$ ). These results suggests that human monoclonal osteoblasts-like cells were influenced by mechanical strain in vitro and may account for some of the cellular effects associated with bone remodelling and orthodontic tooth movement.

**Key words:** Osteoblasts, mechanical forces, bone remodelling, orthodontic treatment, interleukin 1 $\beta$ .

## Introducción

El proceso de reconocer y responder a un estímulo mecánico es vital para el crecimiento y función de cualquier célula humana.<sup>1</sup> Las fuerzas mecánicas se utilizan en la corrección de discrepancias dentofaciales y en la corrección de las maloclusiones durante el movimiento dentario. Sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la transducción de estímulos mecánicos a las respuestas bioquímicas de las células es poco entendido. Los experimentos pioneros llevados a cabo por Hert y colaboradores<sup>2,3</sup> desarrollaron una técnica en la aplicación de presión al hueso *in vivo* sobre varios periodos de tiempo; estos estudios brindaron información básica para conocer el tipo y duración de las fuerzas mecánicas necesarias para estimular la remodelación ósea. A mediados de los años 70 varios grupos desarrollaron sistemas de modelos *in vitro* donde la presión mecánica pudo ser aplicada a células o tejidos, bajo condiciones experimentales controladas.<sup>4-8</sup> Estos estudios demostraron que la presión mecánica tiene respuestas bioquímicas y estructurales en células deformadas. La tensión mecánica también ha demostrado estimular no sólo la síntesis del colágeno,<sup>9</sup> sino también las enzimas responsables para su específica hidrólisis.<sup>8</sup> Utilizando un modelo desarrollado para deformar mecánicamente articulaciones fibrosas *in vitro*, Meikle y colaboradores<sup>7</sup> reportaron un incremento en la producción de la matriz metaloproteinasas (MMPs), colagenasa, gelatinasa, y estromelisin por medio de suturas craneales mecánicamente deformadas, dando un incremento con-

comitante en su específico inhibidor del tejido de la metaloproteinasas (TIMP).<sup>10-12</sup> Finalmente la resorción y formación de hueso está ligada a un proceso de interacciones locales como la producción de factores de crecimiento y a las citocinas.<sup>13</sup> La interleucina-1 $\beta$  es una citocina multifuncional que es liberada de los osteoblastos y por lo tanto tienen la capacidad de estimular la proliferación de otras interleucinas dependientes de las células derivadas de la médula ósea. El conocer los mecanismos moleculares y celulares durante la remodelación ósea es de suma importancia científica y clínica para la medicina y la odontología en la aplicación de nuevas terapéuticas.

## Hipótesis

Los osteoblastos humanos como línea celular (Saos-2) bajo condiciones experimentales de cultivo celular *in vitro* producen interleucina 1 beta con la estimulación mecánica.

## Material y métodos

### *Cultivo de osteoblastos humanos*

La línea celular de osteoblastos humanos es obtenida de la colección celular tipo americana (A.T.C.C.).

Los osteoblastos humanos (Saos-2) son sembrados a una densidad de  $2.5 \times 10^6$  células/cm<sup>2</sup> en frascos de cultivo de tejido (75 cm<sup>2</sup> Costar, Cambridge, MA), creciendo a 37°C en una atmósfera humidificada de 95% de aire y un 5% de CO<sub>2</sub>.

a una proporción de 1:1 en un medio modificado de Dulbecco (Ham's F12-Dulbecco's modified Eagles's medium -DMEM) adicionando un 10% de suero fetal (FCS Globerfarm), 100 U/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina y 0.25 µg/mL de anfotericina. Posteriormente se lavan las células en una solución buffer salina y son sembradas y alimentadas en frascos de cultivo estériles. Con la ayuda de un microscopio de luz de contraste, las células son contadas y alimentadas, al alcanzar confluencia (72 horas) los osteoblastos son removidos con tripsina-EDTA (0.25% Sigma Chemical Co.) respectivamente, y son sembrados en cajas Petri con base flexible ( $1 \times 10^5$ ). Las cajas de Petri son lavadas dos veces con DMEM previo a la siembra de células y se dejan crecer por 24 horas antes de la experimentación.

### Estimulación mecánica de los osteoblastos

Utilizando cajas de Petri Petriperm (Haraeus, Bacher GmbH) con bases flexibles (60 mm) hechas de polifluoritano (PTFE Bacher GmbH, Alemania), son deformadas sobre anillos de caucho en una base de acrílico, se aplica vacío de -11 mg de Hg produciendo un aumento de la superficie del área en un 5% (1.5 mm). La frecuencia de distorsión es controlada por un reostato, a temperatura de 37°C durante el experimento. Una atmósfera de CO<sub>2</sub> está presente durante la deformación de la base de la caja Petri. Grupos de 10 cultivos son aleatoriamente colocados tanto controles como experimentales y son incubados secuencialmente en el mismo aparato. La única diferencia es que el control no será expuesto a la deformación mecánica. Esta deformación será aplicada intermitentemente por 5 segundos cada 180 segundos durante 8, 24, 48 y 72 horas.

### Preparación del medio para su análisis

#### Obtención de la muestra

Después de haber deformado los osteoblastos humanos, el medio de cultivo se recolecta y se centrifuga a 700 rpm a 37°C para remover cualquier partícula de material. El medio de cultivo es almacenado a 20°C hasta que suficiente medio ha sido obtenido para determinar la prueba inmunológica de interleucina 1-β (IL-1β).

### Examen de ELISA (Enzyme-Linked Immunoassay)

#### Prueba para determinación de Interleucina humana 1-β

Una microplaca con anticuerpos monoclonales específicos para IL-1β previamente ya cubierta en los pozos (Quan-

tikine, R & D Systems), se les adiciona 200 µL de medio control y experimental en cada pozo. Los promedios son obtenidos por diluciones seriadas de IL-1β 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. Muestras controles y experimentales son diluidas a la  $x^5$  y  $x^{10}$  y realizadas en duplicado. Después de incubar durante dos horas a 37°C, las muestras son lavadas 3 veces con solución buffer (400 µL solución salina buffer de fosfato PBS) utilizando una máquina de aspiración (Labsystems). Son adicionados e incubados 200 µL de conjugado con una nueva tira provista en el ELISA Kit a temperatura ambiente por más de una hora, posteriormente es lavada la microplaca como se mencionó anteriormente. Se agrega 200 µL de solución de sustrato a cada pozo a un intervalo de 5 segundos e incubado por 20 minutos a temperatura ambiente. Se adiciona 50 µL de solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para detener la reacción, se mide la adsorbancia a 540 nm usando un equipo de espectrofotometría (Labsystems). Una curva logarítmica promedio es dibujada utilizando una computadora y el programa software génesis, y de esta manera se conoce la concentración de IL-1β en las muestras de cultivo.

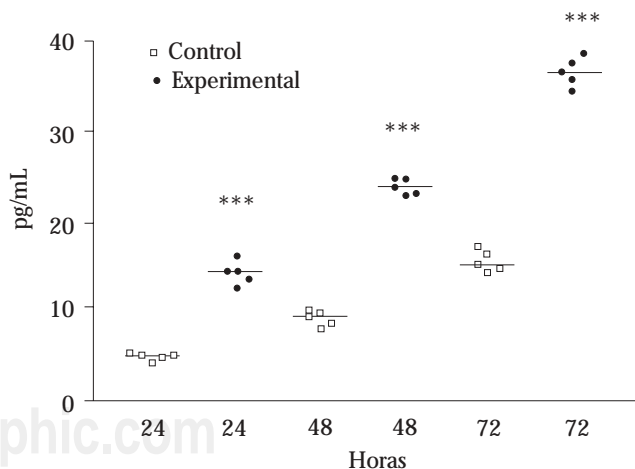
### Resultados

Producción de interleucina-1β en osteoblastos humanos Saos-2 estimulados y no estimulados mecánicamente.

La primera columna representa el periodo en tiempo del control (osteoblastos no estimulados), la segunda columna representa a osteoblastos estimulados que es el grupo experimental (n = 5).

Los resultados representan el promedio de  $\pm$  error estándar (SEM).

La prueba de t fue utilizada para determinar diferencia significativa.



**Figura 1.** Resultados de la producción de interleucina-1β.

\*\*\* estadísticamente altamente significativo  $p < 0.0001$

Los resultados demuestran que no hubo producción de IL-1 $\beta$  a las 8 horas de estímulo, sin embargo a las 24 ( $13.5 \pm 2.1$ ) 48 ( $23.2 \pm 1.3$ ) y 72 horas ( $33.9 \pm 1.9$ ) se encontró una diferencia estadísticamente significativa comparada con el control ( $p < 0.0001$ ). (Figura 1).

## Discusión

Se han desarrollado varios métodos para distorsionar el citoesqueleto de las células en cultivos celulares.<sup>6,14-20</sup> El modelo pionero de caja de Petri desarrollado por Harell y colaboradores<sup>6</sup> demostraron que las células del hueso al ser deformadas mecánicamente, van acompañados por una serie de procesos bioquímicos. En primera instancia, la activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub> con subsecuente desprendimiento del ácido araquidónico resultando en un incremento de la producción de prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>) que activan a la adenil ciclasa; posteriormente, incrementando el calcio intracelular [Ca<sup>2+</sup>]<sup>i</sup> y así estimulando la síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN).

En este estudio se demuestra que la estimulación mecánica de monocapas de cultivos de osteoblastos (Saos-2) *in vitro*, no sintetizan interleucina 1 $\beta$  durante las primeras 8 horas, sin embargo a las 24, 48 y 72 horas fueron detectadas proteínas inmunorreactivas en el medio de cultivo. La IL-1 $\beta$  tiene un papel importante en la osteogénesis y resorción ósea, que de alguna manera incrementa el número de osteoclastos más que la actividad de los ya existentes. Esto fue realizado en estudios a largo plazo utilizando cultivos de médula ósea, en donde se demostró la formación de osteoclastos.<sup>21,22</sup>

La resorción ósea se caracteriza por una secuencia de eventos que incluyen la formación y migración de osteoclastos al sitio de resorción, que en forma coordinada con los osteoblastos favorecen la degradación ósea. Sin embargo, existe una marcada evidencia de que las metaloproteinasas (MMPs) y los productos derivados del metabolismo del ácido araquidónico (PGE<sub>2</sub>) degradan la matriz ósea a través de los osteoclastos<sup>13</sup> y por lo tanto, la IL-1 $\beta$  incrementa este proceso. Este tipo de citocina emplea su efecto pleiotrópico que actúa recíprocamente con los receptores específicos de la pared celular donde se transcriben y aumentan su actividad para identificar otras proteínas y así poder degradar colágeno tipo I realizando otras funciones específicas de los osteoblastos.<sup>23-25</sup>

Desde el punto de vista clínico el aplicar fuerzas ortopédicas a los maxilares o durante la fase temprana del movimiento ortodóncico existe una respuesta inflamatoria aguda, caracterizada por la vasodilatación del ligamento periodontal y migración de leucocitos fuera de los capila-

res.<sup>26-28</sup> Las Interleucinas secretadas por estas células mononucleares pueden interactuar directamente con células óseas o indirectamente con células vecinas, tales como monocitos macrófagos, linfocitos y fibroblastos a través de la producción de interleucinas, prostaglandinas o factores de crecimiento que contribuyen de alguna manera a la remodelación ósea.

## Conclusiones

- a) Bajo condiciones experimentales controladas el cultivo de osteoblastos humanos (Saos-2) *in vitro* no sintetizan interleucina 1 $\beta$  durante las primeras 8 horas, sin embargo a las 24, 48 y 72 horas fueron detectadas en el medio de cultivo en forma significativa comparada con el control.
- b) La producción de IL-1 $\beta$  puede representar un papel importante durante la remodelación ósea a través de los receptores localizados en los osteoblastos, contribuyendo a la interacción de prostaglandinas, factores de crecimiento y diferentes tipos de interleucinas.
- c) Este estudio sugiere que la producción de citocinas derivadas de osteoblastos humanos (Saos-2) de alguna manera tienen efectos asociados con la remodelación ósea durante el tratamiento ortopédico y ortodóncico.

## Bibliografía

1. Wang N, Butler JP, Inber DE. Mechanotransduction across the cell surface and through the Cytoskeleton. *Science* 1993; 260: 1124-1127.
2. Hert J, Liskova M, Landrgot B. Influence of the long-term, continuous bending on the bone. An experimental study on the tibia of the rabbit. *Folia Morphologica* 1969; 17: 389-99.
3. Hert J, Liskova M, Landa J. Reaction of bone to mechanical stimuli. *Folia Morphologica* 1971; 19: 290-300.
4. Lanyon LE, Hartman W. Strain related electrical potentials recorded *in vitro* and *in vivo*. *Calcified Tissue Research* 1976; 22: 315-327.
5. Rodan GA, Bourne LA, Harvey A, Mensi T. Cyclic AMP and cyclic GMP: mediators of the mechanical effects on bone remodelling. *Science* 1975; 189: 467-471.
6. Harell A, Dekel S, Biderman I. Biochemical effect of mechanical stress on cultured bone cells. *Calcified Tissue Research. (Suppl)* 1977; 22: 202-207.
7. Meikle MC, Reynolds JJ, Dungle ST. Rabbit cranial sutures *in vitro*: A new experimental model for studying the response of fibrous joints to mechanical stress. *Calcified Tissue International*. 1979; 28: 137-144.
8. Meikle MC, Sellers A, Reynolds JJ. Effect of tensile mechanical stress on the synthesis of metalloproteinases by rabbit coronal sutures *in vitro*. *Calcified Tissue International* 1980; 30: 77-82.
9. Meikle MC, Heath JK, Hembry RM, Reynolds JJ. Rabbit cranial suture fibroblasts under tension express a different collagen phenotype. *Archives of Oral Biology*. 1982; 27: 609-613.

10. Meikle MC, Heath J, Reynolds JJ. Response of fibrous joint to tensile mechanical stress. *American Journal of Orthodontics*. 1984; 85: 141-153.
11. Meikle MC, Atkinson SJ, Ward RV, Reynolds JJ. Gingival fibroblasts degrade type I collagen films when stimulated with tumor necrosis factor and interleukin-1: Evidence that breakdown is mediated by metalloproteinases. *Journal of Periodontology Research* 1989; 24: 207-213.
12. Meikle MC, McGarrrity AM, Thompson BM, Reynolds JJ. Bone-derived growth factors modulate collagenase and TIMP activity and type I collagen degradation by mouse calvarial osteoblasts. *Bone and Mineral*. 1991; 12: 41-55.
13. Meikle CM, Sharyn B, Hembry RM, Compston J, Croucher PI, Reynolds JJ. Human osteoblasts in culture synthesize collagenase and other matrix metalloproteinases in response to osteotropic hormones and cytokines. *Journal of Cell Science* 1992; 103:1093-1099.
14. Hasegawa S, Sato S, Saito S, Brunette DM. Mechanical stretching increase the number of cultured bone cells synthesizing DNA alters their pattern of protein synthesis. *Calcified Tissue International* 1985; 37:431-436.
15. Banes AJ, Gilber T, Taylor D, Monbureau O. A new vacuum-operated stress-providing instrument that applies static or variable duration cyclic tension or compression to cells *in vitro*. *Journal of Cell Science* 1985; 75: 35-42.
16. Sandy JR, Meghji S, Farndale RW, Meikle MC. Dual elevation of cyclic AMP and inositol phosphate in response to mechanical deformation of murine osteoblasts. *Biochemica et Biophysica Acta* 1989; 1010: 265-269.
17. García-López S. The effects of mechanical stress on cytokine production by human osteoblasts like cells *in vitro*. *Master of Science in Orthodontics Thesis*. University of London 1995a.
18. García-López S, Lee BP, Meikle MC, McDonald F. Cytokine production by human osteoblasts mechanically deformed on flexible dishes. *Bone and Tooth Society* 1995b; 44:55.
19. García-López S, Villanueva R. Comparison of two types of human osteoblasts under cyclic strain *in vitro*. *European Journal of Orthodontics* 1999; 21: 587-588.
20. García-López S, Villanueva R, Bojalil R, Montaña L, Ramírez V. Evaluation of cytokine release in osteoblasts and fibroblasts: an *in vitro* study. *American Association of Orthodontists. Book of abstracts*; 2000: 268.
21. Pfeilschifter J, Chenu C, Bird A, Mundy GR, Roodman GD. Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate the formation of human osteoclast-like cells *in vitro*. *Journal of Bone and Mineral Research* 1989; 4: 113-117.
22. Oreffo RO, Mundy GR, Seyedin SM, Bonewald LM. Activation of the bone derived latent TGF B complex by isolated osteoclasts. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 1989; 158: 817-823.
23. MacDonald BR, Gowen M. Cytokine and Bone. *British Journal of Rheumatology* 1992; 31: 149-155.
24. Gowen M, Wood DD, Ihrle EJ, Meats JE, Russell RG. An interleukin-1 like factor stimulates bone resorption *in vitro*. *Nature* 1983a; 306: 378-380.
25. Gowen M, Meikle MC, Reynolds JJ. Stimulation of bone resorption *in vitro* by a nonprostanoid factor released by human monocytes in culture. *Biochemistry and Biophysics Acta* 1983b; 762: 471-474.
26. Yamasaki K, Miura F, Suda T. Prostaglandins as mediator of bone resorption induced by experimental tooth movement in rats. *Journal of Dental Research*. 1980; 45: 1535-1642.
27. Sandy JR, Harris M. Prostaglandins and tooth movement. *European Journal of Orthodontics*. 1984; 6: 175-182.
28. Davidovitch Z, Nicolay O, Ngan PW, Shanfeld J. Neurotransmitters, cytokines and the control of alveolar bone remodelling in orthodontics. *Dental Clinics of North America* 1988; 32: 411-435.

### Lecturas complementarias:

- Davidovitch Z, Shanfeld JK. Cyclic AMP levels in alveolar bone of orthodontically-treated cats. *Archives of Oral Biology* 1975; 20: 567-572.
- Davidovitch Z, Montgomery PC, Eckerdal O, Gustafson GT. Demonstration of cyclic AMP in bone cells by immuno-histochemical methods. *Calcified Tissue Research* 1976; 19: 305-315.
- Davidovitch Z, Montgomery PC, Shanfeld JL. Guanosine 3'5' monophosphate in bone: Microscopic visualization by an immuno-histochemical technique. *Calcified Tissue Research* 1977; 24: 73-79.
- Dietrich JW, Goodson JM, Raisz LG. Stimulation of bone resorption by various prostaglandins in organ culture. *Prostaglandins* 1975; 10: 231-236.
- Klein DC, Raisz LG. Prostaglandins: stimulation of bone resorption in tissue culture. *Endocrinology* 1970; 86: 1436-1441s.

#### Reimpresos

Dr. Salvador García López  
Av. Río Churubusco 594-101  
entre Mina y Guerrero.  
Col. Del Carmen Coyoacán,  
México, D.F.  
C.P. 041000

Este artículo puede ser visto en:  
[www.medigraphic.com/adm](http://www.medigraphic.com/adm)