



Evaluación de prostaglandina E₂ en la inducción de resorción ósea en cultivos de osteoblastos murinos estimulados con lipopolisacárido

Salvador García-López, *,**,A,B
Diana González Ortiz, ***,A
Héctor Wing, ***,A Rosina
Villanueva*,A

* Profesor Titular.

** Profesor invitado.

*** Pasantes asignados a Proyecto de Investigación de Servicio Social. Licenciatura en Estomatología. Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco.

Resumen

Objetivo: El LPS es un estimulador de la resorción ósea en las enfermedades inflamatorias como la periodontitis, la osteomielitis y algunos tipos de artritis. El propósito del presente estudio fue de evaluar el efecto de 1 µg/mL de LPS adicionado a cultivos de osteoblastos murinos con el fin de evaluar si la PGE₂ induce la producción de RANKL. **Material y métodos:** Los osteoblastos fueron obtenidos de cráneos de ratón recién nacido Balb/c fueron removidos y sometidos a digestión enzimática con 1 mg/mL de tripsina. Las células desprendidas fueron cultivadas a una densidad de 10⁴ en una caja de pozos de 1.0 cm 1 µg/mL de LPS fue adicionado a cada pozo del grupo experimental (n = 5). Se tomó sobrenadante a las 1, 8, 24, 48, y 72 horas respectivamente y almacenado y ensayado para determinar la producción de RANKL y PGE₂ por medio de la técnica de ELISAs (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays). **Resultados:** Los resultados demostraron sobreexpresión de la producción de PGE₂ y RANKL de las 24 a las 48 horas comparadas con el grupo control. La adición de 1 µg/mL de LPS a cultivos de osteoblastos murinos induce la producción de RANKL por diferentes mecanismos incluyendo la PGE₂ en la inducción del proceso de resorción ósea.

Palabras clave: Osteoblastos murinos, RANKL, LPS, PGE₂ pérdida ósea, enfermedad periodontal.

Abstract

Objective: LPS is a stimulator of bone resorption in inflammatory diseases such as periodontitis, osteomyelitis and some types of arthritis. The aim of this study was to examine the effects of 1 µg/mL of LPS in murine osteoblasts under organ culture condition to evaluate whether PGE₂ induce RANKL production. **Material and methods:** Osteoblasts were obtained from mouse skulls from Balb/c mice and plated at cell density of 10⁴ in 1.0 cm dishes. 1 µg/mL of LPS was added to each experimental well (n = 5). Following sampling the culture supernatants at 1, 8, 24, 48, and 72 hours respectively, the supernatants were stored and assayed for PGE₂ and RANKL by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs). **Results:** Results have shown up-regulation of PGE₂ and RANKL from 24 to 48 compared to the control. These data suggest that 1 µg/mL of LPS in murine osteoblasts cultivated induce RANKL production by different signalling mechanisms including PGE₂ which exert their influence during bone resorption.

Key words: Murine osteoblast, RANKL, LPS, PGE₂, bone loss, periodontal disease.

^A Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco.

^B Departamento de Ortodoncia/Hospital General Dr. Manuel Gea González.

Introducción

La pérdida ósea involucra tanto la proliferación de osteoclastos progenitores, como la diferenciación de osteoclastos mononucleares a osteoclastos multinucleares.¹ Los osteoblastos son células que inducen la diferenciación osteoclástica por el contacto de una célula con otra célula.² Los osteoclastos precursores expresan un receptor denominado factor de transcripción κ B (RANK) que pertenece a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF), el cual es modulado por el ligando de RANK (RANKL) (también conocido como ODF, OPGL y TRANCE),³ que es expresado por los osteoblastos en la interacción entre estas dos células, induciendo por lo tanto la diferenciación de osteoclastos mononucleares a través del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF).^{4,5} La expresión de RANKL por el osteoblasto también involucra que los osteoclastos precursores sobrevivan en la culminación y activación de osteoclastos maduros. Esta inducción osteoclástica puede ser mediada por diferentes estímulos, como la hormona paratiroidea (HPT), vitamina D3, prostaglandina E2 (PGE2), interleucina 11 (IL-11), lipopolisacárido (LPS) y carga mecánica entre otros.^{2,6,7} La osteoprotegerina (OPG) también conocida como OCIF o TRI, es un receptor soluble para RANKL que actúa como decodificador natural del sistema de señalamiento RANK-RANKL² el cual inhibe el proceso de la resorción ósea. Normalmente la pérdida severa del hueso se presenta en enfermedades inflamatorias como la periodontitis, la osteomielitis y algunos tipos de artritis.⁸ El lipopolisacárido (LPS), constituyente mayor de las bacterias Gram-negativas, al parecer estimula en forma agresiva la pérdida ósea de estas enfermedades inflamatorias.⁹ Además, los macrófagos, linfocitos y osteoblastos producen prostaglandina E₂ (PGE₂) y citocinas pro-inflamatorias tales como TNF- α e IL-1 en respuesta a la presencia de LPS.¹⁰ El LPS puede estimular la producción de PGE₂ de las células receptoras a través de la inducción del mitógeno de la ciclo-oxigenasa 2 (COX2).¹¹ Sin embargo, en la actualidad al parecer hay diferentes mecanismos por el cual la PGE₂ se involucra en la inducción osteoclástica con la presencia de LPS.

Material y métodos

Diseño del estudio

El presente estudio fue experimental.

Químicos y reactivos

La recombinante murina y anticuerpos del RANKL fueron obtenidos de la compañía Peprotech (USA). La PGE₂ fue

obtenida de R and D Systems (USA). Medios de cultivo, antibióticos, suero fetal de ternera y tripsina EDTA fueron obtenidos de la compañía Gibco (Grand Island, N.Y.). Ratones hembras recién nacidas Balb/c fueron obtenidos del bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, los cuales fueron sacrificados de acuerdo a las guías de investigación aprobadas por el Comité Ético de la UAM.

Cultivos primarios de osteoblastos murinos

Los osteoblastos murinos fueron preparados y caracterizados por la modificación de un método previamente descrito por Heath et al.¹² Al cráneo de 10 ratones hembras recién nacidas (1-2 días) les fueron extraídos los huesos frontales y parietales, éstos 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 1,000 rpm durante 5 minutos, los osteoblastos obtenidos fueron contados en una cámara de New Vawer ajustados a 1×10^3 en 1 mL para ser resuspendidos en cajas Petri de 20 pozos de 1.5 mm en un medio de cultivo F-12 Dulbecco modificado (Ham's F12-Dulbecco's modified Eagles's medium -DMEM) con un 10% de suero fetal bovino (FCS Giberfarr) 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomina y 0.25 μ g/mL de amfotericina, creciendo las células a 37 °C en una atmósfera humidificada de 95% de aire y un 5% de CO₂. El medio de cultivo fue reemplazado cada 48 ó 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 un 5 y 95% de aire. Los cultivos fueron aleatoriamente colocados tanto controles como experimentales y fueron incubados secuencialmente en el mismo lugar.

Ensayo para determinación de RANKL y PGE₂

El sobrenadante fue recolectado durante las 1, 8, 24, 48, y 76 horas de cultivo y centrifugado a 1,000 rpm para

remover cualquier partícula extraña. El sobrenadante fue almacenado a -70°C para poder determinar la producción de RANKL por medio de un ensayo de ELISA. (Enzyme-Linked Immunoassay). Una microplaca con anticuerpos monoclonales específicos para RANKL previamente ya cubierta en los pozos (Peprotech, USA), se les adicionó 200 μL de medio del grupo control y del grupo experimental en cada pozo. Los promedios fueron obtenidos por disoluciones seriadas de RANKL en disoluciones 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 3 veces con solución buffer (400 mL solución salina buffer de fosfato PBS) utilizando una máquina de aspiración (Labsystems). Doscientos μL de conjugado fueron adicionados e incubados con una nueva tira suministrada en el kit de ELISA a temperatura ambiente por más de una hora, posteriormente fue lavada la microplaca como se mencionó anteriormente. Doscientos μL de solución de sustrato fue agregado a cada pozo en un intervalo de 5 segundos e incubado por 20 minutos a temperatura ambiente. Se adicionó 50 μL de solución de H_2SO_4 para detener la reacción, se midió la absorbancia a 540 nm 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.

El ensayo para determinar PGE_2 (R and D Systems) fue parecido al descrito anteriormente siguiendo las instrucciones del estuche.

Análisis estadístico

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

Resultados

En el presente proyecto se investigó si 1 $\mu\text{g/mL}$ de lipopolisacárido indujo la producción de RANKL mediada por PGE_2 en osteoblastos murinos Balb/c cultivados *in vitro* en cajas Petri de 15 mm. Los datos obtenidos se registraron en forma cuantitativa (pg/mL) de acuerdo al 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 pro-

ducción 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 grupo 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 RANKL. Sin embargo, el grupo experimental incrementó su producción paulatinamente a partir de las 8 horas pero presentando diferencia estadísticamente significativa a las 24 y 48 horas (Figuras 1 y 2; $p < 0.001$), posteriormente empezó un decremento llegando a niveles similares comparados con el grupo control. Con respecto a la PGE_2 , los osteoblastos sintetizaron PGE_2 a partir de la 1 $^{\circ}$ a las 72 horas con un incremento paulatino a las 24 horas y un decremento para las 72 horas, sin embargo el grupo experimental al que se le adicionó LPS presentó una diferencia estadísticamente significativa durante las 24 ($p < 0.001$) y 48 ($p < 0.01$) horas comparado con el grupo control (Figuras 3 y 4).

Discusión

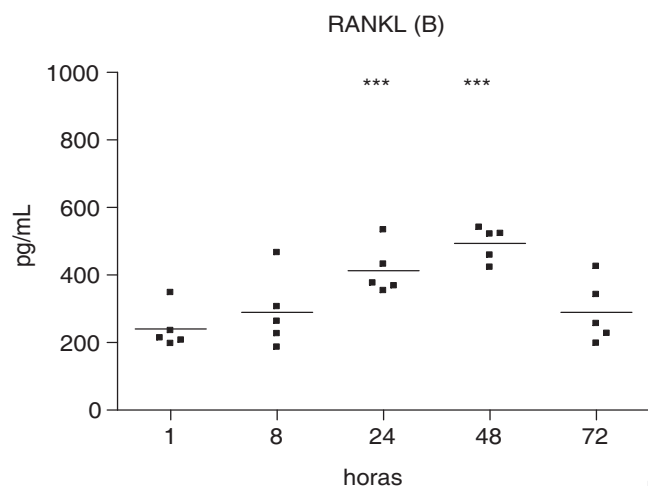
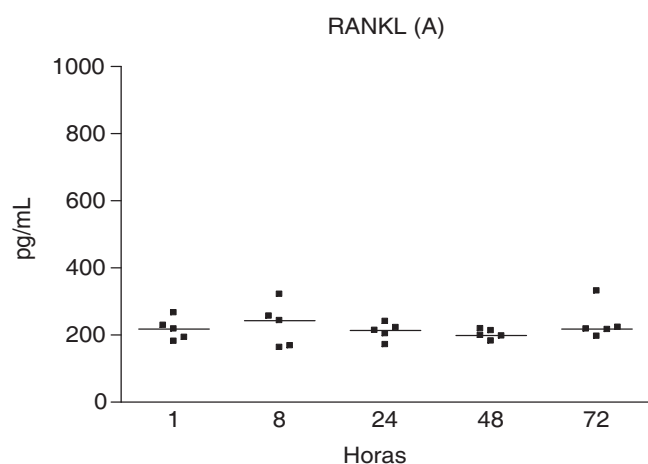
Las citocinas proinflamatorias (ej. IL-1, TNF- α) que son secretadas en el sitio de la inflamación e infección por la presencia del LPS de las bacterias Gram negativas pueden alterar la condición del hueso en especial durante la enfermedad periodontal, resultando en una destrucción patológica del tejido óseo.¹³ Estudios realizados *in vivo* e *in vitro* previamente han sugerido que la producción de PGE_2 en osteoblastos, está relacionada en la inducción de la resorción ósea a través de IL-1, TNF- α y de la presencia de LPS.¹⁴ Tomando en consideración este punto de vista, decidimos realizar un estudio en el que se determinó que el adicionar 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS al medio de cultivo de osteoblastos murinos cultivados *in vitro*, indujo la sobreproducción de RANKL y de PGE_2 al mismo tiempo, deduciendo que la presencia de LPS indujo la producción de PGE_2 la cual sobre reguló la producción de RANKL dando como consecuencia la activación osteoclástica y por lo tanto induciendo la resorción ósea.

La sobre regulación de PGE_2 puede estimular diferentes vías de señalamiento, por ejemplo se ha sugerido que el receptor denominado TLR4 (Toll-Like Receptor 4) fue identificado como mecanismo de transducción de señalamiento para LPS, esta cascada de señalamiento es similar al de la interleucina 1 Rs (IL-1 Rs). Tanto TLR4 y IL-1 Rs utilizan un señalamiento común a través de la molécula

MyD88 y del factor asociado a TRAF-6 (factor asociado al receptor de TNF-6).^{15,16} Macrófagos, linfocitos y células del estroma/osteoblastos expresan TLR4, y producen PGE_2 y citocinas pro-inflamatorias tales como TNF- α e IL-1 en respuesta al LPS,¹⁷ considerando que estos procesos inflamatorios de alguna manera pueden estimular la osteoclastogénesis directa o indirectamente,¹⁸ induciendo la sobreexpresión del receptor activador del factor nuclear

kappa B (RANK) y su ligando RANKL, los cuales 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 a través de RANK.^{19,20} La osteoprotegerina (OPG) que es secretada por los osteoblastos, actúa como un decodificador natural en la inhibición del sistema de señalamiento RANK-RANKL,²¹ la cual interrumpe el proce-

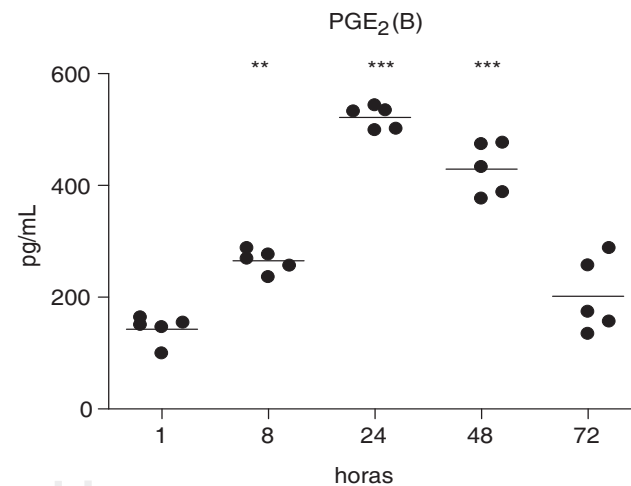
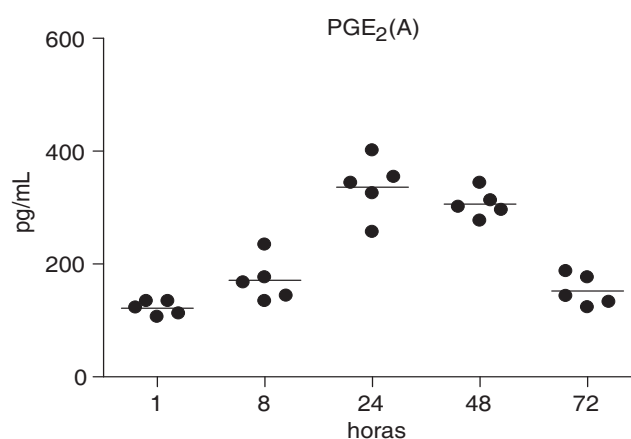
Producción de RANKL en cultivos de monocapas de osteoblastos murinos del grupo control y estimulados con lipopolisacárido.



*** ($p < 0.001$) de RANKL en los osteoblastos estimulados con lipopolisacáridos comparados con los no estimulados.

Figuras 1 y 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 figura A representa el control (osteoblastos no estimulados) y la figura B 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.

Producción de PGE_2 en cultivos de monocapas de osteoblastos murinos del grupo control y estimulados con lipopolisacárido.



** ($p < 0.01$) *** ($p < 0.001$) de PGE_2 en los osteoblastos estimulados con lipopolisacárido comparados con los no estimulados.

Figuras 3 y 4. Monocapas de cultivos de osteoblastos murinos fueron estimulados con un $1 \mu\text{g/mL}$ de lipopolisacárido de 1, a 72 horas, comparados con osteoblastos no estimulados. El sobrenadante fue analizado para PGE_2 por medio de la prueba de ELISA. La figura A representa el control (osteoblastos no estimulados) y la figura B el experimental (estimulado con lipopolisacárido). Los resultados son expresados en promedio \pm (SEM): ($n = 5$). La prueba de U Mann-Whitney fue utilizada para detectar diferencias significativas.

so de resorción ósea. El RANKL es una proteína expresada en varios tipos de células, particularmente osteoblastos y linfocitos T ,²² por lo tanto la sobreexpresión de PGE_2 incrementa la expresión de RANKL y reduce la expresión de OPG^{21,23} un efecto que es mediado por $IL-1\alpha$ ²⁴ a través de la producción de PGE_2 , y no necesariamente por la presencia de LPS,²⁵ esto quiere decir que PGE_2 juega un papel importante como supresor de la expresión de OPG y no en la activación de RANKL por la inducción osteoclástica por LPS. Aunque PGE_2 ha demostrado inducir la expresión de mRNA en RANKL en los osteoblastos,¹⁹ Susawa et al.,²⁶ reportaron que PGE_2 induce la expresión de RANKL mediada a través del señalamiento del adenosin monofosfato cíclico (AMPc), por lo tanto LPS induce la expresión de RANKL por un mecanismo independiente de la producción de PGE_2 , por lo tanto LPS induce la producción de RANKL a través de diferentes señalamientos.²⁷

Conclusiones

La adición de 1 μ /mL de LPS a cultivos de osteoblastos murinos induce la producción de RANKL por diferentes mecanismos incluyendo la PGE_2 .

El poder determinar los mecanismos por el cual el LPS induce la resorción ósea en los procesos inflamatorios crónicos, contribuye al desarrollo de un modelo inmunobiológico futuro para contrarrestar la pérdida ósea durante diferentes tipos de enfermedades inflamatorias incluyendo la enfermedad periodontal.

Bibliografía

- Baron R, Net L, Louvard D, Courtoy PJ. Cell-mediated extracellular acidification and bone resorption: evidence for a low pH in resorbing lacunae and localization of a 100-KD lysosomal membrane protein at the osteoclast ruffled border. *Cell Biology* 1985; 101: 2210-2222.
- Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin J. Modulation of osteoclasts differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand family. *Endocrine Rev* 1999; 20: 345-357.
- Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tomestko ME, Roux ER, Teepe MC, BDuBose RF, Cosman D, Galibert L. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 1997; 390: 175-179.
- Fuller K, Owens JM, Jagger CJ, Wilson A, Moss R, Chambers TJ. Macrophage colony-stimulating factor stimulates surgical and chemotactic behavior in isolated osteoclasts. *J Exp Med* 1993; 178: 1733-1744.
- Jimi E, Shoto T, Koga T. Macrophage colony-stimulating factor and interleukin- 1α maintain the survival of osteoclast-like cells. *Endocrinology* 1995; 136: 808-811.
- Feldman M, Brenman FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *A Rev Immunol* 1996; 14: 397-440.
- García-López S, Meikle MC, Villanueva RE, Montañó L, Massó F, Ramírez-Amador V, Bojalil R. Mechanical deformation inhibits IL-10 and stimulates IL-12 production by mouse calvarial osteoblasts *in vitro*. *Arch Oral Biol* 2005; 50: 449-452.
- Nair SP, Meghji S, Wilson M, Reddi K, White P, Henderson B. Bacterially induced bone destruction: mechanism and misconceptions. *Infect Immun* 1996; 64: 2371-2375.
- Abu-Amer Y, Ross FP, Edwards J, Teitelbaum SL. Lipopolysaccharide-stimulated osteoclastogenesis is mediated by tumor necrosis factor via its p55 receptor. *J Clin Invest* 1997; 100: 1557-1562.
- Schletter J, Heme H, Ulmer AJ, Rietschel ET. Molecular mechanism of endotoxin activity. *Arch Microbiol* 1995; 164: 383-387.
- Hwang D. Modulation of the expression of cyclooxygenase-2 by fatty acids mediated through Toll-like receptor 4-derived signaling pathways. *FASEB J* 2001; 15: 2556-2561.
- Heath JK, Atkinson SJ, Meikle MC. Mouse osteoblasts synthesize collagenase in response to bone resorbing agents. *Biochem Biophys Acta* 1984; 802: 151-154.
- Ellies LG, Aubin JE. Temporal sequences of interleukin 1α mediated stimulation and inhibition of bone formation by isolated fetal rat calvaria cells *in vitro*. *Cytokine* 1990; 2: 430-437.
- Sakuma S, Kato Y, Suda M. Impaired bone resorption by lipopolysaccharide *in vivo* in mice deficient in the prostaglandin E receptor EP4 subtype. *Infect Immun* 2000; 68: 6819-25.
- Romaga MA, Yeh WC, Sarosi I, Duncan GS, Furlonger A. TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective Interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Gen Dev* 1999; 13: 1015-1019.
- Baud V, Liu Z, Bennett B. Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF" and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effectors domain. *Genes Development* 1999; 13: 1297-308.
- Lynn WA, Golenbock DT. Lipopolysaccharide antagonists. *Immunol Today* 1992; 13: 271-276.
- Nair SP, Meghji S, Wilson M, Reddi K, White P, Henderson B. Bacterially induced bone destruction: mechanism and misconceptions. *Infect Immun* 1996; 64: 2371-2375.
- Yasuda H, Shima N, Nakagawa N. Identify of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis *in vitro*. *Endocrinology* 1998; 139: 1329-1337.
- Yasuda H, Shima N, Nakagawa K, Yamaguchi M, Kinosaki S et al. Osteoclasts differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3597-3601.
- Suda T, Takahashi N, Udagawa N, IIMI E, Gillespie MT, Martin J. Modulation of osteoclast differentiation and function by new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocrine Rev* 1999; 20: 345-357.
- Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC

- et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 1997; 390: 175-180.
23. Feldman M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* 1989; 14: 397-440.
 24. Tanabe N, Maeno M, Naoto S, Kyosuke F, Tanaka H, Ogiso B, Ito K. IL-1 α stimulates the formation of osteoclast-like cells by increasing M-CSF and PGE₂ production and decreasing OPG production by osteoblasts. *Life Sci* 2005; 77: 615-626.
 25. Suda K, Udagawa N, Sato N, Takami M, Itoh K, Woo J, Takahashi N, Nagai K. Suppression of osteoprotegerin expression by prostaglandin E₂ is crucially involved in lipopolysaccharide-induced osteoclast formation. *J Immunol* 2004; 172: 2504-2510.
 26. Susawa T, Miyaura C, Inanda M, Maruyama T, Sugimoto Y, Ushikubi F, Ichikawa T, Narumiya S, Suda T. The role of prostaglandin E receptor subtypes (EP1, EP2, EP3 and EP4) in bone resorption: an analysis using specific agonist for the respective EPs. *Endocrinology* 2000; 141: 1554-1561.
 27. Kikuchi T, Matsuguchi T, Tsuboi N, Mitani A, Tanaka S, Matsuoka G et al. Gene expression of osteoclast differentiation factor is induced by lipopolysaccharide in mouse osteoblasts via Toll-like receptors. *J Immunol* 2001; 166: 3574-3581.

Reimpresos:
 Salvador García-López
 Calzada del Hueso Núm. 1100,
 Col. Villa Quietud, 04960.
 Tel. 5483-7565/5659-32-39
 E-mail: sgarcia@correo.xoc.uam.mx
 Este documento puede ser visto en:
www.medigraphic.com/adm