

La elevada glucosa altera la respuesta anti-apoptótica del estímulo mecánico en osteocitos de ratón MLO-Y4

High glucose alters the antiapoptotic response to mechanical stimulation in MLO-Y4 osteocytic cells

Maycas M¹, Bravo-Molina B², Fernández de Castro L², Pozuelo JM², Forriol F², P Esbrit¹, Rodríguez de Gortázar A²

¹ Laboratorio de Metabolismo Mineral y Óseo, IISS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid, España. ² IMMA-Facultad de Medicina, Universidad San Pablo-CEU, Madrid.

Resumen

El estrés oxidativo es clave en el envejecimiento y en los estados diabéticos. La carga mecánica es decisiva para mantener la masa ósea. La respuesta del hueso a los estímulos mecánicos parece reducirse con el envejecimiento y probablemente en la enfermedad ósea provocada por la diabetes. Entender los mecanismos mediante los que el estrés oxidativo afecta a la función de las células óseas, y en concreto a la mecanotransducción en el osteocito, podría proporcionar nuevas dianas moleculares para mejorar los tratamientos actuales y el diseño de otros nuevos para prevenir la pérdida de masa ósea. Nuestros resultados indican que un medio de alta glucosa («diabético») ejerce un efecto negativo sobre la capacidad de los osteocitos para responder a estímulos mecánicos, a través de la interacción con la β -catenina. Además, estos hallazgos sugieren que el estímulo mecánico promueve la viabilidad osteocítica, al menos en parte, a través de la producción de la proteína relacionada con la parathormona (PTHrP).

Palabras clave:

Estrés oxidativo, diabetes, osteocito, PTHrP.

Abstract

Oxidative stress is a key factor in aging and diabetes. Mechanical loading is critical to maintain bone mass. The response of bone to mechanical stimuli appears to be reduced with aging and probably in bone disease caused by diabetes. Understanding the mechanisms by which oxidative stress affects function of bone cells, and specifically to osteocyte mechanotransduction, may provide new molecular targets to improve current treatments and design new treatments to prevent bone loss. Our results indicate that high glucose medium («diabetic») has a negative effect on the ability of osteocytes to respond to mechanical stimuli affecting β -catenin and apoptosis. Moreover, these findings suggest that the mechanical stimulus promotes viability osteocytic, at least in part, through production of parathyroid hormone related protein (PTHrP).

Key words:

Oxidative stress, diabetes, osteocytes, PTHrP.

Introducción

La mecánica es fundamental para la integridad del esqueleto. Los osteocitos, células mayoritarias del tejido óseo, son los principales responsables de «sentir» los estímulos mecánicos y de transformarlos en una respuesta biológica,

en un proceso denominado mecanotransducción [1]. La estimulación mecánica inhibe la apoptosis de los osteocitos mediante un mecanismo que implica la fosforilación de MAP quinasas (ERKs) [2][3]. La vía de señalización Wnt/ β -catenina parece estar involucrada en los mecanismos de supervivencia tras el estrés mecánico en estas células [4-6]. La diabetes mellitus induce efectos deletéreos en el crecimiento y la función de los osteoblastos mediante mecanismos poco definidos, asociados a una disminución de la proteína relacionada con la PTH (PTHrP) y su receptor tipo 1 (PTH1R)

Correspondencia

A Rodríguez de Gortázar
Universidad San Pablo-CEU. Campus de Montepíncipe
28667 Boadilla del Monte, Madrid, España
e-mail: argortazar@ceu.es

[7]. Nuestro grupo ha demostrado un aumento en la apoptosis osteoblástica y osteocítica *in vivo* en ratones con diabetes tipo 1 [8]. Sin embargo, no hay estudios previos que hayan explorado si el estado diabético puede afectar a la respuesta de supervivencia de los osteocitos tras el estímulo mecánico. Nuestro objetivo en el presente trabajo fue analizar el efecto de la alta glucosa (AG) sobre el efecto antiapoptótico inducido por estímulos mecánicos en la línea osteocítica bien caracterizada de ratón MLO-Y4.

I Material y métodos

Cultivo celular y estímulos mecánicos

La línea celular osteocítica MLO-Y4 (donada por la doctora Lynda Bonewald) y las células MLO-Y4-GFP (donadas por la doctora Teresita Bellido) se cultivaron en α -MEM con 2,5% de suero fetal bovino (SFB), 2,5% de suero de ternera (SC) y penicilina-estreptomina al 1%, en 5% de CO₂ a 37 ° C. Para los experimentos, se sembraron 20.000 células/cm² en una matriz de colágeno tipo 1, incubadas con o sin alta glucosa (AG) (25 mM) (o manitol, control osmótico) durante 24 horas. Posteriormente, las células se sometieron o no (controles) a un flujo laminar de fluido (FF) (10 dinas/cm² durante 5 minutos) en un sistema Flexcell® Streamer® [4][9], o a un medio hipotónico (240 mOsm) durante 1 hora; como control se utilizó una solución isotónica (317 mOsm) [10]. En algunos casos, las células se pre-incubaron con PTHrP (1-36) (100 nM) antes de añadir el tampón isosmótico control, o con el antagonista del PTH1R, [Asn¹⁰, Leu¹¹, D-Trp¹²] PTHrP (7-34) amida [PTHrP (7-34)] [7].

Ensayos de muerte celular/apoptosis

Las células MLO-Y4 se trataron con el agente pro-apoptótico etopósido (50 μ M) durante 6 horas después del estímulo mecánico. La muerte celular se cuantificó por exclusión de azul tripán, y la apoptosis se evaluó mediante la condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear (utilizando células MLO-Y4-GFP). Para cada condición experimental, se calculó el porcentaje de células no viables frente al total de células. La muerte celular inducida por el etopósido en células sin estímulo mecánico representó 13,6 \pm 0,8 % o 30,3 \pm 0,4 % (normalizado a 100% en cada caso), evaluado por exclusión de azul tripán o por morfología nuclear, respectivamente; comparado con 1 \pm 0,5 % en las células no tratadas con etopósido.

PCR a tiempo real

El ARN total celular se extrajo con Trizol (Invitrogen, Groningen, Holanda). La síntesis del ADNc y la PCR a tiempo

real se llevaron a cabo en el sistema ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA) siguiendo un protocolo descrito [4][5]. Se utilizaron cebadores y sondas TaqMan específicos de ratón para los genes PTHrP, PTH1R, DKK-1 (Assay-by-DesignSM; Applied Biosystems). Los resultados se expresaron en número de copias de ARNm, calculado para cada muestra usando el valor del ciclo umbral (Cycle Threshold, Ct). La amplificación del ARNr 18S (control constitutivo) se realizó en paralelo con el resto de genes.

Análisis de transferencia western

La proteína total se extrajo de las células MLO-Y4 con una solución de lisis estándar (RIPA). Las proteínas (40 μ g) se separaron por SDS-PAGE (10-12% poli(acrilamida)) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (GE-Amersham, Buckinghamshire, UK). Se bloqueó con 2,5% de leche desnatada en 0,05% Tween-salino fosfatado, a 4° C toda la noche; seguido de incubación con anticuerpo monoclonal de ratón anti- β -catenina (Abcam, Cambridge, MA); y los anticuerpos policlonales de conejo anti-p-GSK3 β (Cell Signalling, Beverly, MA), anti-ERK 1/2 y anti-p-ERK 1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴) (Cell Signalling). Se utilizó un anticuerpo policlonal de cabra anti- β -actina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) como control de carga. Tras incubación con la correspondiente IgG-peroxidasa de rábano, se reveló con ECL (GE, Healthcare); y la intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría.

Análisis estadístico

Los resultados son media \pm EEM. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. La significación estadística ($p < 0,05$) de las diferencias fue evaluada por pruebas no paramétricas (Kruskal-Wallis o Mann Whitney, en su caso), utilizando un paquete estadístico (SPSS).

I Resultados

Efectos de la AG sobre la viabilidad celular

Para determinar si concentraciones elevadas de glucosa en el medio de cultivo ejercen algún efecto sobre la protección ejercida por el estímulo mecánico en los osteocitos, sometimos las células de ratón MLO-Y4 a una concentración de 5 mM (normoglucosa, NG) o 25 mM (AG) de glucosa, o manitol como control osmótico, 24 horas antes de aplicarles el estímulo mecánico (FF) durante 5 minutos. Tras este tiempo, las células fueron tratadas con etopósido durante 6 horas para inducir la apoptosis. Observamos que el estímulo mecánico protegió de la muerte solo en células en normoglucosa, pero no en las células incubadas en AG ni en

las células tratadas con 25 mM de manitol, sugiriendo que el efecto deletéreo de la AG puede deberse, al menos en parte, al efecto osmótico (Figura 1).

Efectos de la AG en la activación de la vía Wnt/ β -catenina

La estimulación mecánica inducida por el FF o por choque hiposmótico indujo la fosforilación de la glucógeno sintasa quinasa (GSK)-3 β y la consecuente estabilización de β -catenina. La concentración elevada de glucosa revirtió este efecto de la estimulación mecánica (Figura 2).

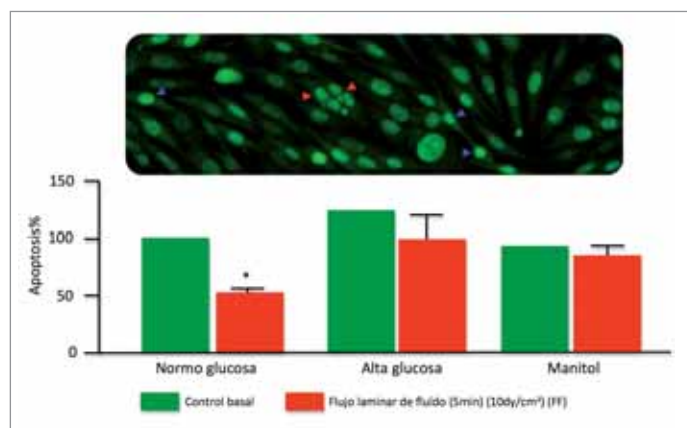


Fig. 1. Alteraciones en la apoptosis (mediante morfología nuclear) por inducción de estímulo mecánico mediante FF en células MLO-Y4, pre-incubadas en AG o NG durante 24 h, seguidas de la adición de etopósido (50 μ M) durante 6 h (panel inferior). Los resultados son medias \pm EEM de tres experimentos independientes por triplicado. * $p < 0.05$ vs el resto de condiciones. Imagen representativa de células MLO-Y4-GFP apoptóticas (panel superior).

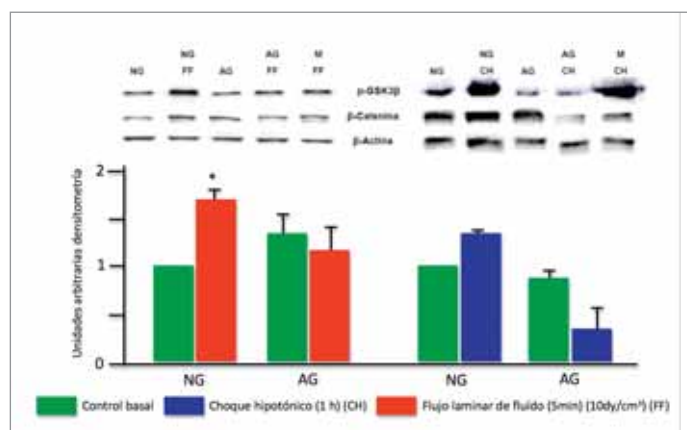


Fig. 2. Cambios en la fosforilación de GSK3 β y en la estabilización de β -catenina inducidos por estímulos mecánicos en células MLO-Y4, pre-incubadas en AG o NG durante 24 h (panel izquierdo). Se muestran los resultados correspondientes a los cambios en β -catenina como medias \pm EEM de 2 experimentos independientes por triplicado. Se muestran autodiagramas representativos en cada caso. * $p < 0.05$ vs NG.

Implicación del sistema PTHrP/PTH1R sobre los efectos de la AG

A continuación, quisimos evaluar el papel de la AG en la expresión génica del sistema PTHrP/PTH1R tras estimulación mecánica. Observamos que la expresión del ARNm del PTH1R disminuyó 6 horas después de la aplicación de los estímulos mecánicos, tanto por el FF como por el choque hipotónico. La AG tuvo un efecto similar, disminuyendo también la expresión de este receptor (Figura 3). Por otra parte, la estimulación mecánica estimuló la expresión de la PTHrP y este efecto no fue modificado por la presencia de concentraciones elevadas de glucosa en el medio de cultivo (Figura 3).

El tratamiento con el péptido N-terminal de la PTHrP reprodujo los efectos de la estimulación mecánica sobre la viabilidad celular. En cambio, el antagonista del PTH1R, PTHrP (7-34), abolió el efecto protector de la estimulación mecánica por choque hipotónico (Figura 3).

Estos resultados indican que la AG afecta negativamente a la capacidad de los osteocitos para responder a los estímulos mecánicos, a través de la interacción con la β -catenina. Además, estos datos sugieren que el estímulo mecánico promueve la viabilidad osteocítica, al menos en parte, a través de la PTHrP. |

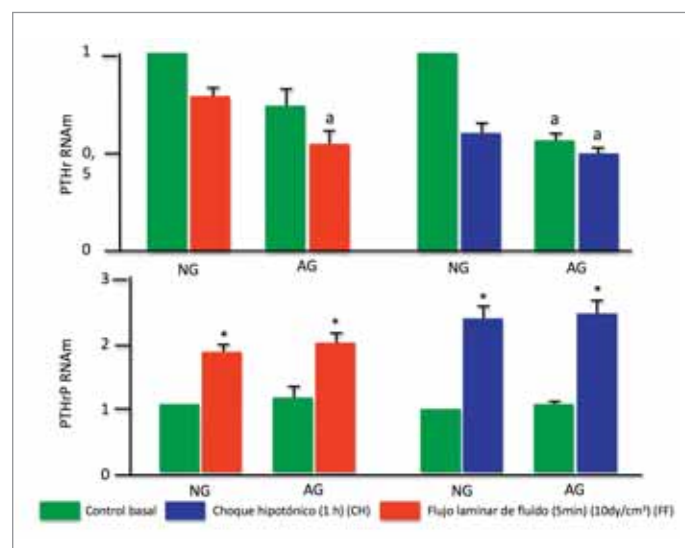


Fig. 3. Alteraciones en la expresión génica de PTH1R (panel superior izquierdo) y PTHrP (panel inferior izquierdo) tras el estímulo mecánico en células MLO-Y4, pre-incubadas en AG o NG durante 24 h. Los resultados son medias \pm EEM de al menos dos experimentos independientes por triplicado. ^a $p < 0.05$ vs NG; * $p < 0.05$ vs valor correspondiente sin estímulo mecánico.

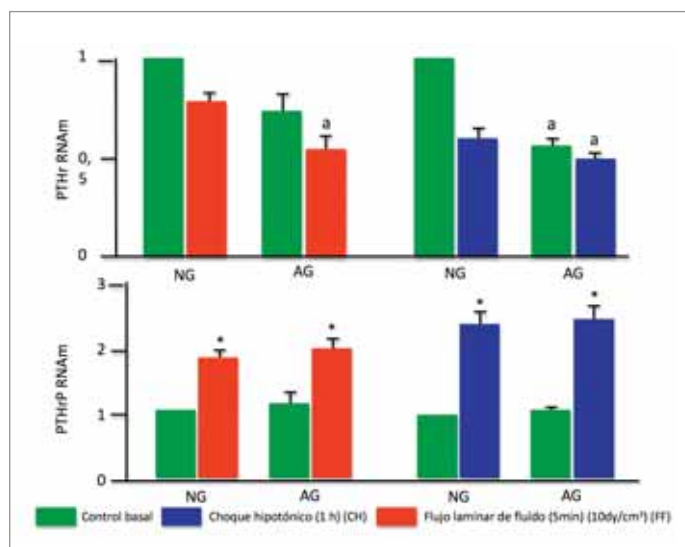


Fig. 4. Cambios en la viabilidad celular (mediante exclusión de azul tripán) por inducción de estímulo mecánico mediante choque hipotónico en células MLO-Y4, pre-incubadas en AG o NG durante 24 h (panel superior); o en NG con o sin PTHrP (1-36) o el antagonista PTHrP (7-34) durante 1 h (panel inferior), seguido de la adición de etopósido (50 μ M) durante 6 h. Los resultados son medias \pm EEM de tres experimentos independientes por triplicado. * $p < 0.05$ vs el resto de condiciones.

Agradecimientos

El presente trabajo ha sido realizado gracias a una Ayuda a la Investigación concedida por FUNDACIÓN MAPFRE MEDICINA. M. Maycas es becaria de la Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bonewald LF. Mechanosensation and transduction in osteocytes. *Bonekey Osteovision* 2006; 3:7-15.
- Plotkin LI, Mathov I, Aguirre JI, Parfitt AM, Manolagas SC, Bellido T. Mechanical stimulation prevents osteocyte apoptosis: requirement of integrins, Src kinases, and ERKs. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 289:633-43.
- Aguirre JI, Plotkin LI, Gortázar AR, O'Brien CA, Manolagas SC, Bellido T. A novel ligand-independent function of the estrogen receptor is essential for osteocyte and osteoblast mechanotransduction. *Biol Chem* 2007; 282:25501-8.
- Gortázar AR, Martín-Millán M, Bravo B, Plotkin LI, Bellido T. Crosstalk between caveolin-1/extracellular signal-regulated kinase (ERK) and β -catenin survival pathways in osteocyte mechanotransduction. *J Biol Chem* 2013; 288:8168-75.
- Sawakami K, Robling AG, Ai M, Pitner ND, Liu D, Warden SJ, *et al.* The Wnt co-receptor LRP5 is essential for skeletal

mechanotransduction but not for the anabolic bone response to parathyroid hormone treatment. *J Biol Chem* 2006; 281:23698-711.

- Robinson JA, Chatterjee-Kishore M, Yaworsky PJ, Cullen DM, Zhao W, Li C, *et al.* Wnt/beta-catenin signalling is a normal physiological response to mechanical loading in bone. *J Biol Chem* 2006; 281: 31720-8.
- Lozano D, De Castro LF, Dapía S, Andrade-Zapata I, Manzarbeitia F, Álvarez-Arroyo MV, *et al.* Role of parathyroid hormone-related protein in the decreased osteoblast function in diabetes-related osteopenia. *Endocrinology* 2009; 150:2027-35.
- Portal-Núñez S, Lozano D, De Castro LF, De Gortázar AR, Nogués X, Esbrit P. Alterations of the Wnt/beta-catenin pathway and its target genes for the N- and C-terminal domains of parathyroid hormone-related protein in bone from diabetic mice. *FEBS Lett* 2010; 584:3095-100.
- Brown TD. Techniques for mechanical stimulation of cells in vitro: a review. *J Biochem* 2000; 33:3-14.
- Chen X, Macica CM, Ng KW, Broadus AE. Stretch-induced PTH-related protein gene expression in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 2005; 20:1454-61.

Conflicto de intereses

Los autores no hemos recibido ayuda económica alguna para la realización de este trabajo. Tampoco hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial. Ninguna entidad comercial ha pagado, ni pagará, a fundaciones, instituciones educativas u otras organizaciones sin ánimo de lucro a las que estamos afiliados.