

# El grado de glicosilación del colágeno óseo regula la adhesión y la capacidad de biomineralizar de las células óseas

A. Bello, A.H. Márquez y K. Noris-Suárez

Universidad Simón Bolívar/Departamento de Biología Celular, Caracas, Venezuela

**Abstract**— In the bone tissue, collagen is the most abundant protein, conforming 90% of the organic matrix of this mineralized structure. Different works indicate that in postmenopausal osteoporosis, the early degradation of the bone tissue seems to be due to the presence of bone collagen in a condition of overglycosylation, especially in the trabecular bone. To understand the role of the glycosylation of the collagen molecule and how it can regulate functions of the bone cells, such as cellular adhesion and biomineralization, is the main objective of the present work. 8 rats were ovariectomized and another 8 were sham-operated (control group). After 45 days the rats were sacrificed, femurs were extracted and the bones were decalcified in order to obtain the collagen matrix mineral free. Primary cultures of bone cells were obtained from calvaria of neonatal rats. The adhesion and differentiation (alkaline phosphatase activity and biomineralization) of these cells were evaluated on the collagen bone matrix obtained of the ovariectomized and control rats. The results of this work show a greater adhesion of the osteoblastic cells on the bone collagen for the control group in comparison with the adhesion found for the ovariectomized group, in the first two hours. Additionally, cell FA activities and mineralization on material differ between control and ovariectomized animals bone collagen samples. In conclusion, in the present work we present evidence that suggest that bone cells can recognize differences in the degree of glycosylation of the collagen matrix in ovariectomized animals in comparison with the control group, and the cellular response is different as a consequence of these variations of the extracellular material.

**Palabras claves**— Glicosilación del colágeno, matriz ósea, osteoporosis postmenopausal, osteoblastos.

## I. INTRODUCCIÓN

El colágeno tipo I, proteína fundamental de la matriz ósea, está sometida a modificaciones postraduccionales, entre las cuales está la glicosilación de residuos específicos de hidroxilisina. Las modificaciones postraduccionales difieren para cada tipo de colágeno, e incluso en el mismo tipo de colágeno, en el caso del hueso se ha reportado que existen diferencias en el grado de glicosilación si este corresponde al hueso trabecular o al cortical. Siendo esta proteína la más abundante de la matriz orgánica del hueso (representa el 90 %) se estudia en el área de la bioingeniería

de tejidos con el fin de entender mejor la relación entre la estructura y la función de la misma. Se sabe además que alteraciones en la disposición espacial (dada por el grado de glicosilación) puede alterar las propiedades de resistencia de las fibrillas de colágeno así como la deposición del mineral del tejido. En alteraciones como la osteoporosis postmenopausal, donde la privación de estrógenos causa un incremento en la tasa de degradación ósea versus la formación, ha sido reportado que el grado de glicosilación de la matriz colagénica del hueso trabecular se ve incrementado en comparación con individuos no-osteoporóticos [1-3]; Sin embargo hasta la fecha no se han realizado estudios *in vitro* que permitan verificar si efectivamente el grado de glicosilación de la matriz colagénica del hueso puede ser reconocida por las células óseas, respondiendo de forma diferente como consecuencia a estas variaciones.

En el presente trabajo se evaluó si los osteoblastos (responsables de formar tejido óseo y regular el metabolismo del hueso) eran capaces de reconocer diferencias en el grado de glicosilación del colágeno, mostrando respuestas celulares diferentes ante el material.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Preparación de matrices colagénicas del modelo animal

Para la preparación de matrices colagénicas se emplearon 16 ratas Sprague-Dowley adultas de 100 días de edad, hembras, 8 fueron sometidas bajo anestesia a una ovariectomía y las 8 restantes fueron sometidas a falsa operación (SHAM-operated). Fueron sacrificadas a los 45 días luego de la operación tiempo en el cual desarrollaron la condición de osteoporosis. Los huesos largos fueron extraídos, lavados y desmineralizados, empleando el tratamiento descrito por Noris-Suárez et al [2]. Una vez descalcificadas las muestras óseas, se separó el colágeno de la región ósea cortical y el de la región ósea trabecular. Las muestras fueron cortadas, liofilizadas y conservadas a -20°C para posteriores análisis

### B. Cultivo de células osteoblásticas

Los osteoblastos fueron extraídos y cultivados siguiendo el método descrito por Noris-Suárez et al [4]. Las células fueron mantenidas a 37 °C en atmósfera húmeda y 5% CO<sub>2</sub>.

### C. Evaluación de la adhesión celular

En placas de 96 pocillos se colocaron muestras de colágeno óseo de 2 x 2 mm aproximadamente. Se emplearon 6 muestras de colágeno de cada condición, cortical y trabecular de animales ovariectomizados (OVX) y sometidos a falsa operación (SHAM). Todas las muestras a estudiar fueron colocadas en la placa de cultivo. La adhesión celular se evaluó colocando una suspensión de 30.000 cel/ml en cada uno de los pocillos que contenían las muestras de colágeno. A las 2 y 4 hrs. se contaron las células remanentes (no adheridas) empleando un hemocitómetro, previamente teñidas con la tinción vital de azul de tripano y se calcularon las células adheridas al material.

### D. Determinación de actividad de fosfatasa alcalina (FA)

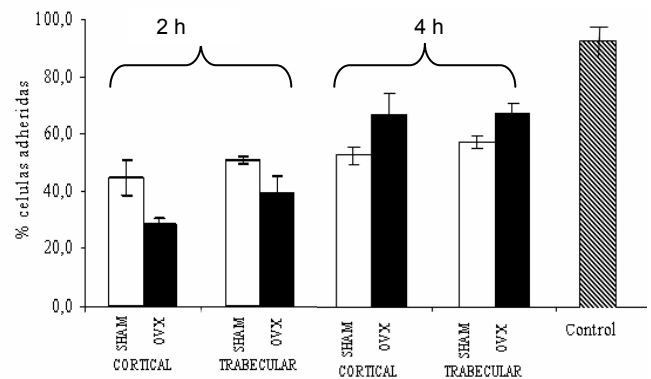
Para determinar la actividad FA se tomaron 10 µL de cada medio recolectado a los diferentes días de tratamiento. La actividad se determinó siguiendo el método descrito por Bowes et al [5]. Brevemente, empleando a concentraciones finales de 50mM buffer dietanolamina/HCL (DEA) pH 9,6 y 10 mM p-nitrofenil fosfato como sustrato, se incubó la reacción a 37°C por 10 min. Finalmente se detiene la reacción con 50 µL de NaOH 1M. La absorbancia se leyó empleando un lector de ELISA (Bio-Teck) a 405 nm. Previo a la determinación de fosfatasa alcalina se realizó la curva de calibración con p-nitrofenol.

### E. Mineralización

El proceso de biomineralización se indujo suplementando el medio de cultivo con  $1 \times 10^{-7}$  M dexametasona (DXM), 50 µg/ml ac. ascórbico, 10 mM β-glicerofosfato (β-GP) y 10% suero fetal bovino (SFB) por un total de 14 días de tratamiento. El medio fue cambiado cada 3-4 días hasta completar el estudio. Los controles (pocillos sin matriz colagénica) fueron tratados solo con 50 µg/ml ác. ascórbico, 10 mM β-GP. La cantidad de calcio precipitado en forma de mineral (cristales de hidroxiapatita) fue determinada usando la tinción con Rojo de Alizarina siguiendo el procedimiento descrito por Stanford et al [6] Se realizó tanto la evaluación cualitativa (registro fotográfico) como la cuantitativa.

## III. RESULTADOS

Los resultados de adhesión celular se muestran en la figura 1. Se encuentra que a las primeras dos horas de incubación de las células con las diferentes matrices, se tiene un predominio de adhesión de las células sobre la matriz proveniente de los animales control (SHAM) sin diferencias importantes entre el tipo de tejido óseo (cortical o trabecular). Sin embargo fue posible verificar que a las 4 hrs. de incubación, esta tendencia se invierte, aumentando de forma significativa la adhesión de las células en las matrices provenientes de los animales OVX en comparación con los animales control (SHAM), encontrándose que para las 4 hrs de incubación células-material hubo un 72% y 73% de células adheridas sobre la matriz cortical y trabecular, respectivamente en los animales OVX. Mientras, que para la matriz proveniente de los animales control (SHAM-op) la adhesión fue de 57% y 62 % para el hueso cortical y trabecular, respectivamente.



**Fig. 1.-** Adhesión celular observada para los cultivos control y experimentales a las 2 y 4 horas expresadas en porcentaje con respecto a las células sembradas inicialmente (n=6)

Para ello se trataron las células con un esteroide sintético, llamado Dexametasona (DXM), el cual ha sido ampliamente reportado como un compuesto que orienta las células preosteoblásticas a diferenciarse en células osteoblásticas maduras (capaces de expresar actividad de fosfatasa alcalina, entre otras actividades específicas) en una primera fase y en células osteocíticas, en una fase final de diferenciación *in vitro*, donde se alcanza la formación de nódulos de mineralización o biomineralización completa del material.

Para evaluar el proceso de diferenciación de los cultivos se decidió determinar la actividad de fosfatasa alcalina (FA) en el medio de cultivo a los diferentes días de tratadas las

células en cultivo, así como la cantidad de mineral depositado al final del periodo del tratamiento con DXM.

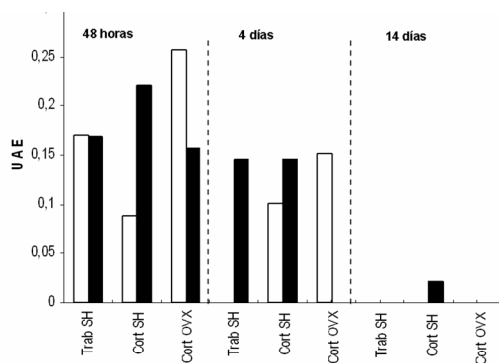
En el caso de la determinación de FA, se estandarizó el procedimiento ya que se debía verificar que el rojo fenol presente en el medio de cultivo no interfiriera con la reacción colorimétrica. Por ello, previamente, se determinó la actividad FA presente en la fracción citosólica, la fracción particulada (correspondiente a membranas celulares) y en un medio de cultivo luego de 4 días. En este caso se empleó medio de cultivo fresco, como control negativo. Se encontró que la actividad FA es detectable en el medio de cultivo de las células, en cantidades similares a la determinada en la fracción citosólica. Adicionalmente se confirmó que el rojo fenol no interfiere con la determinación colorimétrica.

Los resultados de la actividad de FA para los cultivos control (células óseas crecidas en la placa de cultivo en ausencia de matriz colagénica) se reportan en la Tabla 1, como unidad de actividad enzimática (UAE). Se puede ver que la actividad de FA en el cultivo control responden al tratamiento de diferenciación con DXM, encontrándose una elevada actividad al inicio del tratamiento con una progresiva disminución a medida que avanza los días de tratamiento con DXM, siendo indetectable en el medio para el día 14 de tratamiento.

En base a estos resultados se evaluó la actividad de FA de las diferentes matrices colagénicas obtenidas de los animales OVX y SHAM-op.

**Tabla 1.-** Actividad fosfatasa alcalina en cultivos control

Tiempo	UAE
24 h	0,07
4 días	0,017
14 días	0

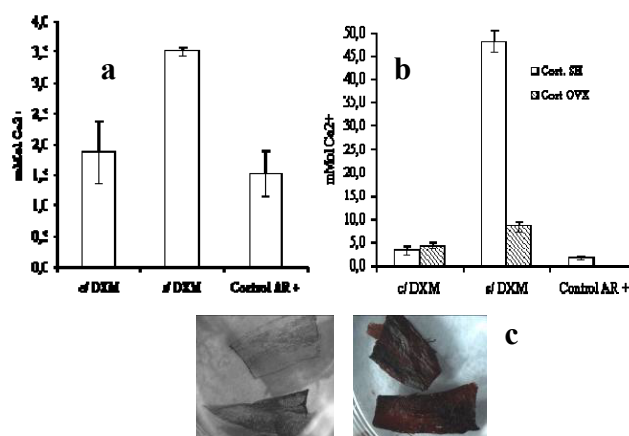


**Fig. 2** Actividad FA de las células con matriz ósea c/ DXM (barras blancas) y s/DXM (barras negras) de Tejido trabecular del grupo SHAM-op, tejido Cortical del grupo SHAM-op, Tejido Trabecular del grupo OVX a los 4 y 14 días de tratamiento.

En la figura 2 se muestran en un gráfico de barras la actividad FA medida en el medio de cultivo, proveniente de los cultivos a las 48 hrs., 4 y 14 días de tratamiento con DXM. Resulta evidente en la figura una mayor actividad FA a las 48 hrs de cultivo con las matrices en comparación con los restantes lapsos de tratamiento. Resalta además el hecho que las células sembradas en la matriz proveniente de los animales OVX fueron las que mostraron la mayor actividad de FA, con el tratamiento de DXM.

Una vez completados los 14 días del tratamiento con DXM, se determinó el grado de biomineralización en las diferentes matrices estudiadas, trabecular y cortical de animales control (SHAM-op) y cortical de animales OVX. Como control de biomineralización, para este ensayo se utilizó un cultivo de células osteoblásticas sin material colagénico al cual se le realizó el mismo tratamiento con DXM que al resto de las muestras. Los resultados de biomineralización se pueden ver en la figura 3. Se observa que las células óseas fueron capaces de biomineralizar las matrices colagénicas. Encontrándose que se produjo la deposición de mineral en todos los casos, tanto en cultivos con y sin DXM (ver figura 3, inserto).

La determinación cuantitativa permitió evidenciar que mientras el tratamiento con DXM parece inducir una limitada mineralización del colágeno óseo cortical, sin diferencias evidentes entre el colágeno de animales control y OVX, en el caso de los cultivos sin DXM si se encuentra una diferencia en la cantidad de mineral depositado, siendo hasta 4 veces mayor el grado de mineralización de la matriz proveniente de animales control en comparación con el mineral depositado en la matriz de animales OVX.



**Fig. 3.-** Estudio cuantitativo con rojo de alizarina para determinar calcio depositado sobre las matrices óseas. a) Matrices Corticales de OVX y SHAM-op. b) matriz trabecular SHAM-op. c) Estudio cuantitativo: control (derecha), tejido cortical teñido con rojo de alizarina (izquierda)

#### IV. DISCUSION

Trabajos previos demostraron que el grado de glicosilación del colágeno óseo se incrementa en animales ovariectomizados, especialmente en el tejido óseo trabecular, donde ocurre la pérdida de tejido óseo en forma más pronunciada [1-3]. Siendo esta proteína la más abundante en el tejido óseo y debido al papel tan importante que ella ejerce el mantenimiento de este tejido, resulta de gran importancia entender como el grado de glicosilación de la matriz colagénica puede regular las funciones celulares de las células que componen el hueso.

Al evaluar la adhesión se encontró que existen diferencias en el reconocimiento temprano de la matriz (2 hrs) donde la adhesión se hizo más pronunciadas en las matrices cortical y trabecular de los animales control al compararlo con los OVX. A pesar de que en el tiempo la tendencia de adhesión se invierte, se puede decir que el grado de glicosilación de la matriz rigiere este evento celular primario, como es la adhesión, la cual a su vez es limitante para los siguientes eventos celulares (proliferación y diferenciación).

Los resultados de evaluación de la actividad de FA indican un proceso inicial mas marcado de diferenciación de las células sembradas en presencia de colágeno óseo de animales OVX, sin embargo pareciera, por los resultados obtenidos de la deposición de mineral, que ese efecto temprano de diferenciación no es determinante en el proceso total de biomineralización.

La determinación cuantitativa de calcio realizada con Rojo de alizarina en los cultivos sin tratamiento con DXM reveló una cantidad mucho mayor de mineral depositado para las tres tipos de matrices en estudio (cortical OVX, trabecular y cortical SHAM). Esto es consecuente con lo reportado por Wong et al [7] quienes hallaron un efecto estimulador de los glucocorticoides (compuestos esteroideos) cuando éstos están presentes desde el inicio del cultivo de células óseas, pero un efecto inhibitor si son añadidos tras un período de crecimiento celular *in vitro*. Se pudiera considerar incluso que las células respondieron mejor en ausencia del esteroide sintético (DXM) encontrándose en presencia del material. Sin embargo las diferencias notables entre la matriz derivada de animales OVX en comparación con los control (SHAM-op) sugiere que el grado de glicosilación de la matriz pudiera estar influenciado la efectividad del proceso de mineralización en si mismo.

#### V. CONCLUSIONES

En conclusión, en el presente trabajo se muestran evidencias que sugieren que las células óseas reconocen

diferencias en el grado de glicosilación de las matriz colagénica de animales ovariectomizados en comparación con los animales control y presentan respuestas celulares diferentes como consecuencia de estas variaciones.

#### RECONOCIMIENTOS

La presente investigación fue financiada parcialmente por fondos otorgados por el Decanato de Investigación y Desarrollo de la Universidad Simón Bolívar, y por fondos otorgados por el FONACIT (Proyectos G-2005000173, G200100900 y LAB-2000001152). Agradecemos al personal del bioterio de la Universidad Simón Bolívar, especialmente al Sr. Luis Hidalgo.

#### REFERENCIAS

1. Michalsky M, Noris-Suárez K, Bettica P, Pecile A, Moro L. (1993) Rat cortical and trabecular bone collagen glycosylation are differently influenced by ovariectomy. *Biochem Biophys Res Commun* 192: 1281-8.
2. Noris-Suárez, K., Romanello, M. Betica, P. Moro, L. (1996) Collagen type I of rat cortical and trabecular bone differs in the extent of posttranslational modifications. *Calcif Tissue Int* 58: 76-79
3. Moro L, Bettica P, Romanello M, Noris-Suárez K. (1997) 17 $\beta$ - estradiol and tamoxifen prevent the over- glycosylation of rat trabecular bone collagen induced by ovariectomy. *Eur J Clin Chem Biochem* 35(1): 29-33.
4. Noris Suárez K., Barrios de Arenas I., Vásquez M., Barón Y, Atias I., Bermúdez J., Morillo C., Olivares Y., Lira J. (2003) Caracterización biológica empleando células osteoblásticas de vidrios del sistema SiO<sub>2</sub>.Na<sub>2</sub>O.CaO K<sub>2</sub>O.MgO.P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> modificados con Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y B<sub>2</sub>O<sub>3</sub> *Rev. Latin. Metal. Mater* 23(1): 82-88.
5. Bowes, G.N. y Mc. Comb, R.B. A Continous Spectrophotometric Method for Measuring The Activity Of Serum Alkaline Phosphatase. *Clin. Chem.* 12, 70 (1966)
6. Stanford, C. M.; Jacobson, P. A.; Eanes E. O.; Lemke L.A.; Midura, R. J. 1995. *J. Biological Chemistry*, 9420-9428
7. Wong M-M, Rao LG, Ly H, Hamilton L, Tong J, Sturtridge W, McBroom R, Aubin JE, Murray TM. (1990) Long-term effects of physiologic concentrations of dexamethasone on human bone-derived cells. *J Bone Miner Res* 5: 803-813.

Autor de correspondencia:

Autor: Karem Noris-Suárez.  
 Instituto: Universidad Simón Bolívar.  
 Carretera Nacional de Baruta.  
 Ciudad: Caracas.  
 País: Venezuela.  
 E-mail: [mailto:knoris@usb.ve](mailto:mailto:knoris@usb.ve)