

# EFFECTOS PRODUCIDOS POR EL 17 $\beta$ -ESTRADIOL, EL TAMOXIFENO Y EL RALOXIFENO SOBRE LA ACTIVIDAD DE OSTEÓBLASTOS HUMANOS EN CULTIVO

DOCTORANDA: C. C. MÉNDEZ DÁVILA  
DIRECTORES: C. DE LA PIEDRA GORDO Y A. RAPADO ERRAZTI  
CALIFICACIÓN: SOBRESALIENTE *CUM LAUDE*  
FECHA DE LECTURA: 24 DE MAYO DE 2001

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA. FACULTAD DE MEDICINA.  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA. MADRID.

En este trabajo nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1) Utilizar el cultivo primario de osteoblastos humanos procedentes de hueso trabecular de mujeres postmenopáusicas como modelo experimental para el estudio de la interacción del 17 $\beta$ -estradiol (ES), y 2 moduladores selectivos de los receptores estrogénicos, tamoxifeno (TA) y raloxifeno (RA), sobre la actividad remodeladora ósea.
- 2) Estudiar el efecto del ES 10<sup>-8</sup>M, TA 10<sup>-8</sup>M y RA 10<sup>-8</sup>M sobre la proliferación celular y la síntesis de colágeno en osteoblastos humanos en cultivo.
- 3) Estudiar los efectos producidos por el ES 10<sup>-8</sup>M, el TA 10<sup>-8</sup>M y el RA 10<sup>-8</sup> sobre la expresión génica y la síntesis de la interleucina 6 (IL-6) tanto constitutiva como estimulada por la interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) en osteoblastos humanos en cultivo.

Para ello, los osteoblastos se obtuvieron de hueso trabecular de mujeres postmenopáusicas sanas, entre 55 y 75 años de edad. Las células se cultivaron según el método descrito por Nacher et al, y se caracterizaron utilizando la síntesis de osteocalcina y de fosfatasa alcalina como marcadores que permiten identificar las células como osteoblastos. Los experimentos se realizaron siempre con células entre el segundo y quinto pase.

Los osteoblastos en confluencia fueron mantenidos durante 24 horas en medio de cultivo DMEM sin rojo de fenol y sin suero fetal, con albúmina sérica bovina (BSA) al 0,1%. Entonces, se añadieron

ES 10<sup>-8</sup>M (Sigma), TA 10<sup>-8</sup>M (Zeneca), RA 10<sup>-8</sup>M (Lilly) o vehículo (etanol) con o sin IL-1 $\beta$ . Después de 24 horas se determinaron los niveles de IL-6 y de péptido aminoterminal de procógeno I (PINP) en el medio de cultivo. La proliferación celular fue medida a través de un ensayo metabólico y de conteo celular a las 48 y a las 96 horas de incubación.

Para estudiar la expresión de IL-6, las células fueron cultivadas hasta la confluencia en placas Petri. El medio fue reemplazado por DMEM libre de rojo de fenol y de suero, con BSA al 0,1%. Después de 24 horas las células fueron tratadas con ES 10<sup>-8</sup>M, TA 10<sup>-8</sup>M o RA 10<sup>-8</sup>M durante 1, 2, 3 y 6 horas, o durante 3 horas con cada uno de estos agentes e IL-1 $\beta$  simultáneamente. Los niveles de mRNA fueron evaluados a través de la transcripción reversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Se coamplificó el gen humano de la gliceraldeído-3-fosfato dehidrogenasa (GAPDH) como control de un gen constitutivo.

Los hallazgos obtenidos en las condiciones experimentales utilizadas son los siguientes:

El cultivo primario de osteoblastos humanos procedente de hueso trabecular de mujeres postmenopáusicas constituye un modelo experimental útil y reproducible para el estudio de las interacciones entre el ES 10<sup>-8</sup>M, TA 10<sup>-8</sup>M y RA 10<sup>-8</sup>M y las células formadoras de hueso.

Las observaciones morfológicas y las propiedades funcionales expresadas por las cé-

lulas humanas en estudio permiten identificarlas como osteoblastos.

La adición de ES 10<sup>-8</sup>M, TA 10<sup>-8</sup>M y RA 10<sup>-8</sup>M produjo un aumento significativo en la proliferación celular de osteoblastos humanos en cultivo a las 48 y 96 horas, con respecto a las células controles (sin adición de estímulo).

La adición de ES 10<sup>-8</sup>M, TA 10<sup>-8</sup>M y RA 10<sup>-8</sup>M no produjo ninguna variación significativa sobre la síntesis de colágeno por los osteoblastos medida a través de los niveles del PINP.

El ES 10<sup>-8</sup>M, TA 10<sup>-8</sup>M y RA 10<sup>-8</sup>M no produjeron una disminución en los niveles constitutivos de IL-6 en el medio de cultivo de osteoblastos humanos. Estos fármacos no produjeron tampoco un descenso en el incremento de la síntesis de IL-6 mediado por la adición de IL-1 $\beta$  al medio de cultivo.

El ES 10<sup>-8</sup>M, TA 10<sup>-8</sup>M y RA 10<sup>-8</sup>M no produjeron ninguna variación significativa sobre la expresión constitutiva del mRNA de la IL-6, ni sobre el incremento de expresión producido por la IL-1 $\beta$  en osteoblastos humanos en cultivo.

Las beneficiosas acciones del 17 $\beta$ -estradiol, tamoxifeno y raloxifeno demostradas sobre la masa ósea parecen no estar mediadas a través de un descenso de la liberación de la IL-6, agente favorecedor de la resorción ósea, sino posiblemente a través de otros factores liberados por los osteoblastos que actuarían sobre la actividad osteoclástica o por acciones directas del estradiol, raloxifeno o tamoxifeno sobre los osteoclastos.