
TRABAJO ORIGINAL

Efectos de los productos de glicación avanzada (AGEs) y alendronato sobre el desarrollo osteoclastico: posibles mecanismos de acción

Effect of Advanced Glycation Endproducts and Alendronate on osteoclastic development: possible mechanisms of action

PREMIO: "Dra. Sara Chiochio" XVII Congreso SAEM 2011

Gangoiti María Virginia*, McCarthy Antonio Desmond, Cortizo Ana María

GIOMM (Grupo de Investigación en Osteopatías y Metabolismo Mineral), Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. Calle 47 y 115, (1900) La Plata, Argentina

RESUMEN

Introducción: En la Diabetes Mellitus se ha descripto un incremento en el riesgo de fracturas, las cuales podrían asociarse a la acumulación de productos de glicación avanzada (AGEs) que alteran la función de los osteoclastos (Oc), células gigantes multinucleadas encargadas de resorber el hueso. Los bifosfonatos (BP), drogas ampliamente usadas en enfermedades óseas, inhiben la actividad resorptiva de los Oc, aunque su uso en pacientes diabéticos es controversial.

Objetivo: Estudiar el efecto de AGEs y alendronato sobre el desarrollo de Oc en cultivo, así como los posibles mecanismos involucrados en la acción de estos agentes.

Materiales y Métodos: Se cocultivaron macrófagos Raw264.7 y osteoblastos UMR-106 durante 8 días, con BSA o AGE (50-200 µg/ml), con o sin alendronato (10^{-8} - 10^{-4} M). Se evaluó el efecto de estas condiciones de cultivo sobre la formación de Oc (número de los mismos, y actividad de fosfatasa ácida tartrato-resistente [TRAP]), la expresión de RAGE (Receptor de AGEs) en los Oc, y la expresión del ligando de RANK (RANKL) en los osteoblastos por inmunofluorescencia indirecta.

Resultados: Los AGEs (50-200 µg/ml) inhibieron en forma dosis-dependiente la TRAP (10-30 %) y el número de osteoclastos generados (55 %), similarmente a lo inducido por bajas dosis de alendronato (10^{-8} M- 10^{-6} M). La coincubación de bajas dosis de alendronato con 100 µg/ml de AGEs no indujo una inhibición adicional a la de los AGEs sobre la actividad de TRAP o el número de Oc. Altos niveles de alendronato (10^{-5} M- 10^{-4} M) inhibieron la actividad TRAP (20-25 % respecto a BSA y 17 % respecto de AGEs), así como el número de Oc desarrollados en presencia de AGEs (16 % con respecto a AGEs).

Los Oc incubados en presencia de 100 µg/ml AGEs mostraron un incremento significativo en la expresión de RAGE (152 % respecto de BSA), situación similar a la observada postincubación con alendronato 10^{-8} M (130 % respecto de BSA). Por el contrario, altas dosis de alendronato (10^{-5} M) no modificaron la expresión del RAGE en los cocultivos incubados con BSA (95 % respecto de BSA). Por otro lado, bajas dosis de alendronato en presencia de AGEs no alteraron la "up-regulation" del RAGE inducida por los AGEs (145 % respecto de BSA). Sin embargo, cuando los Oc se incubaron con AGEs y Ale 10^{-5} M, esta dosis del bifosfonato bloqueó el efecto estimulante de los AGEs sobre la expresión de RAGE (105 % respecto de BSA).

La incubación con 100 µg/ml AGE produjo una inhibición (50 % respecto de BSA), en la expresión del RANKL en los osteoblastos. El alendronato (10^{-8} M- 10^{-5} M) indujo también una inhibición del RANKL en forma dosis dependiente (65-47 % respecto de BSA). Por otro lado en presencia de AGEs, el alendronato (10^{-8} M- 10^{-5} M) no modificó la inhibición de la expresión del RANKL inducida por los AGEs (59-45 % del BSA).

Conclusiones: Los AGEs y el alendronato inhiben el número y diferenciación de Oc en cultivo, con un efecto aditivo entre ambos a altas concentraciones de alendronato. También reducen la expresión de RANKL

en osteoblastos, lo cual podría explicar parcialmente sus efectos sobre el reclutamiento y la maduración de Oc. Los AGEs y bajas dosis de alendronato aumentan la expresión de RAGE en Oc. **Rev Argent Endocrinol Metab 49: 12-19, 2012**

Los autores declaran no poseer conflictos de interés.

Palabras clave: Diabetes Mellitus, productos de glicación avanzada, bifosfonatos, osteoclastos

ABSTRACT

Introduction: Patients with Diabetes mellitus frequently show osteopenia and/or osteoporosis, as well as an increase in low-trauma fracture risk. This has been postulated to be caused partially by the accumulation of advanced glycation endproducts (AGEs) in bone extracellular matrix. AGEs could affect the homeostasis of bone cells, such as osteoblasts, osteocytes and osteoclasts. Osteoclasts (Oc) are multi-nucleated cells specialized in resorbing bone. Bisphosphonates (BP) are drugs widely used for treatment of bone diseases, and their principal mechanism of action is to inhibit the resorptive action of Oc. However, the use of BP for the treatment of patients with Diabetes-related bone disease is still controversial.

Objective: To study the effect of AGEs and Alendronate (an N-containing BP) on the development of Oc in culture, as well as possible mechanisms of action involved in these effects.

Materials and Methods: RAW264.7 macrophages and UMR106 osteoblasts were co-cultured for 8 days, with BSA or AGEs (50-200 $\mu\text{g/ml}$), with or without Alendronate (10^{-8} – 10^{-4}M). The effect of these culture conditions on Oc formation was evaluated (number of Oc, cell-associated tartrate-resistant acid phosphatase [TRAP] activity), as well as Oc expression of RAGE (receptor for AGEs), and osteoblastic expression of RANK ligand (RANKL). These last two parameters were evaluated by indirect immunofluorescence, in order to estimate the expression and sub-cellular distribution of both membrane-associated proteins.

Results: AGEs (50-200 $\mu\text{g/ml}$) dose-dependently inhibited TRAP activity (10-30 %) and the number of multinucleated Oc (55 %). Similar results were observed for low doses of Alendronate (10^{-8}M – 10^{-6}M). The co-incubation of low doses of Alendronate with 100 mg/ml of AGEs, did not induce an additional inhibition of TRAP activity or Oc number, to that observed for AGEs alone. High levels of Alendronate (10^{-5}M – 10^{-4}M) inhibited Oc TRAP activity (20-25 % inhibition versus BSA, and 17 % versus AGEs), and also decreased the number of Oc formed in the presence of AGEs (16 % inhibition versus AGEs).

Oc incubated in the presence of 100 $\mu\text{g/ml}$ AGEs, showed a significant increase in the expression of RAGE (152 % versus BSA). Similar results were found after incubating with 10^{-8}M Alendronate (130 % versus BSA). On the contrary, high doses of Alendronate (10^{-5}M) did not affect the expression of RAGE in co-cultures incubated with BSA (95 % versus BSA). On the other hand, low doses of Alendronate in the presence of AGEs, did not affect the up-regulation of RAGE induced by AGEs (145 % versus BSA). However, when the Oc were co-incubated with AGEs and 10^{-5}M Alendronate, this dose of BP was able to block the stimulation of RAGE expression induced by AGEs (105 % versus BSA).

In osteoblasts, incubation with 100 $\mu\text{g/ml}$ AGEs induced an inhibition in the expression of RANKL (50 % versus BSA). Alendronate (10^{-8}M – 10^{-5}M) also inhibited RANKL expression in a dose-dependent manner (65-47 % versus BSA). However, Alendronate (10^{-8}M – 10^{-5}M) did not modify the AGEs-induced inhibition in osteoblastic RANKL expression (59-45 % versus BSA).

Conclusions: AGEs and Alendronate inhibit the number and differentiation of Oc in culture, with an additive effect for both agents at high Alendronate concentrations. AGEs and Alendronate also reduce the osteoblastic expression of RANKL, which could partially explain their effects on the recruitment and maturation of Oc. In addition, AGEs and low doses of Alendronate increase the expression of RAGE in cultured Oc, and this effect correlates with their inhibition of Oc development. **Rev Argent Endocrinol Metab 49: 12-19, 2012**

No financial conflicts of interest exist.

Key words: diabetes mellitus, advanced glycation endproducts, bisphosphonates, osteoclasts

INTRODUCCIÓN

La Diabetes Mellitus se ha asociado con una serie de complicaciones que afectan el sistema esquelético, conocidos de manera colectiva como “enfermedad diabética ósea” u “osteopatía diabética⁽¹⁾. En este sentido, se ha descrito un

incremento en el riesgo de fracturas asociada a esta patología.

Nuestro grupo y otros investigadores, han demostrado que estas alteraciones podrían asociarse a la acumulación de productos de glicación avanzada (AGEs) en el hueso, alterando la función de células óseas como osteoblastos y

osteoclastos que son centrales en los procesos de formación y remodelado óseo.

En un estudio reciente se demostró que los niveles séricos de los AGEs carboximetil-lisina y pentosidina se encuentran aumentados en pacientes con osteoporosis, cuando se los compara con individuos sanos⁽²⁾.

A nivel celular, los AGEs interactúan con receptores específicos tales como el RAGE, y así podrían modular no sólo la diferenciación y mineralización osteoblástica, sino también la osteoclastogénesis. De esta manera pueden reducir tanto el remodelado óseo como el recambio de colágeno, facilitando la acumulación de más AGEs en la matriz extracelular ósea⁽³⁾.

El exceso de AGEs resultante puede contribuir entonces a las alteraciones óseas que se observan en el envejecimiento y en la Diabetes Mellitus.

Por otro lado los bifosfonatos (BP) son drogas ampliamente usadas para el tratamiento de enfermedades óseas como la osteoporosis posmenopáusicas. Los BP inhiben la actividad resorptiva de los osteoclastos, y sus efectos y mecanismos de acción han sido ampliamente estudiados. Sin embargo, no existe actualmente un consenso para el tratamiento con estos fármacos, de las alteraciones óseas asociadas con Diabetes Mellitus, y en ese sentido cobra relevancia estudiar la posible interacción de los AGEs con BP como el alendronato, en su acción sobre células óseas como los osteoclastos.

Los objetivos de este trabajo fueron:

- Estudiar el efecto de AGEs y alendronato sobre el desarrollo de osteoclastos en cultivo
- Investigar los posibles mecanismos involucrados en dichos efectos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó un modelo de cocultivo de células Raw 264.7 y UMR-106. Los monocitos/macrófagos Raw 264.7 son células que tienen el potencial de diferenciarse *in vitro* en células osteoclasticas, en la presencia del ligando del receptor activador de NF- κ B (RANKL). En nuestro caso la fuente de RANKL fueron los osteoblastos UMR-106. Las células osteoclasticas resultantes del cocultivo presentan rasgos característicos de osteoclastos maduros: son células multinucleadas que expresan elevada actividad TRAP (fosfatasa ácida tartrato resistente). Se cocultivaron macrófagos Raw264.7

y osteoblastos UMR-106 durante 8 días⁽⁴⁾, en presencia de 50-200 μ g/ml de albúmina sérica bovina control (BSA) o glicada "in vitro" (AGEs). Los cocultivos se realizaron también en presencia de diferentes dosis de alendronato (10^{-8} - 10^{-4} M). La formación y maduración de osteoclastos se evaluó a través del recuento de células multinucleadas, y de la medida de la actividad TRAP. Para determinar la actividad TRAP, los cocultivos se lavaron con PBS y se solubilizaron en 250 μ l de Tritón X-100 0.1 % y se reservaron en tubos eppendorf. Una alícuota del extracto celular se incubó con el buffer de reacción (412 mM ácido acético, 0.209 % Triton X-100, 412 mM NaCl, 4.12 mM EDTA, 10.6 mM ácido ascórbico, 10.1 mM p-nitrofenilfosfato, 41.6 mM tartrato de sodio a pH = 5.5) durante 1 h a 37 °C en oscuridad. (Vol. final: 1 ml)⁽³⁾. Luego se detuvo la reacción agregando 200 μ l de NaOH 300 mM. Los cambios colorimétricos se midieron por Absorbancia a 405 nm. Con otra alícuota del extracto se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford. Se expresaron los resultados como Actividad TRAP específica = nmol de p-NP/ mg de Prot.* min.

Se evaluó el efecto de las diferentes condiciones experimentales sobre la expresión osteoclastica del receptor RAGE, por inmunofluorescencia indirecta. En otros experimentos, se cultivaron osteoblastos UMR-106 en presencia y ausencia de diferentes dosis de BSA, AGEs y/o alendronato, evaluando luego por inmunofluorescencia indirecta la expresión osteoblástica de RANKL.

Para realizar el ensayo de inmunofluorescencia indirecta las células subconfluentes crecidas sobre cubreobjetos de vidrio se lavaron 2 veces en PBS frío y se fijaron con paraformaldehído 4 % en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego se permeabilizaron con metanol 100 % durante 4 minutos a -20 °C y se lavaron con PBS. Con el fin de evitar las uniones inespecíficas, se realizó un bloqueo con 1 % BSA en PBS (pH=7.4) durante 30 minutos. Se incubó con el primer anticuerpo (anti RAGE, anti RANK-L, en los ensayos correspondientes) 1:200 con PBS (pH=7.4) 1 % BSA durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavó con PBS tres veces durante 10 minutos. Posteriormente, se realizó una incubación con el segundo anticuerpo adecuado marcado con fluoresceína en PBS pH=7.4, durante 60 minutos a temperatura ambiente (1:200). Se lavó con PBS tres veces durante 10 minutos y se montó con glicerol 80 %. Se observaron los preparados con un microscopio de fluorescencia Nikon 5000 y se tomaron fotografías

usando una cámara Nikon coolpix. Los resultados se cuantificaron usando el programa Image-J.

RESULTADOS

En primer lugar evaluamos el efecto de los AGEs sobre el proceso de diferenciación osteoclástica. Estos compuestos (50-200 µg/ml) inhibieron en forma dosis-respuesta la actividad TRAP (10-30 % respecto de BSA no glicado) así como el número de células multinucleadas obtenidas por cocultivo (55 % respecto de BSA, para 100 µg/ml AGEs).

A continuación, investigamos el efecto de diferentes dosis de alendronato (en coincidencia con BSA o AGEs) sobre la diferenciación de los osteoclastos. Para estos experimentos elegimos una dosis de 100 µg/ml de AGE, la cual inhibe aproximadamente un 13 % la actividad TRAP y un 55 % el número de osteoclastos, respecto al control con igual dosis de BSA.

Como resultado de estos experimentos, encontramos que bajas dosis de alendronato (10⁻⁸M-10⁻⁶M) coincubados con BSA indujeron una inhibición significativa sobre la actividad TRAP de los cocultivos (respecto de BSA) (Tabla I). Dicha inhibición fue cuantitativamente similar a la encontrada con 100 µg/ml AGEs en ausencia de alendronato. Sin embargo, cuando se coincubaron bajas dosis de alendronato con AGEs, no se observó una inhibición adicional sobre la actividad TRAP (Tabla I) ni sobre el número de osteoclastos (Tabla II), respecto de la ya producida en presencia de AGEs por sí solo.

Por otro lado, altos niveles de alendronato (10⁻⁵M-10⁻⁴M) coincubados con 100 µg/ml de BSA

o AGEs, inhibieron significativamente la actividad TRAP: 20-25 % respecto de BSA, o 17 % de inhibición respecto de AGEs, respectivamente (Tabla I). Similarmente, el número de osteoclastos fue significativamente inhibido por dicha co-incubación: 67 % respecto a BSA y 16 % respecto de AGEs (Tabla II).

A continuación, investigamos si los efectos inducidos por los AGEs y el alendronato podrían involucrar la expresión del RAGE, uno de los receptores para los AGEs que ha sido previamente descrito en osteoclastos. Los osteoclastos incubados en presencia de 100 µg/ml AGEs mostraron un incremento significativo en la fluorescencia asociada al RAGE (152 % respecto de BSA) (Figura 1). La coincidencia de alendronato 10⁻⁸M y BSA indujo también un incremento significativo en la fluorescencia asociada al RAGE (130 % respecto de BSA). Por otro lado, altas dosis de alendronato (10⁻⁵M) no produjeron efectos significativos sobre la expresión de RAGE. Finalmente, aunque bajas dosis de alendronato coincubadas con AGEs no alteraron el incremento en la expresión del RAGE inducida por los AGEs (145 % respecto de BSA), cuando los osteoclastos se coincubaron con AGEs y alendronato en altas dosis (10⁻⁵M) este bifosfonato bloqueó el efecto estimulante de los AGEs sobre la expresión de RAGE (105 % respecto de BSA).

Finalmente, evaluamos por inmunofluorescencia indirecta el posible efecto de los AGEs y el alendronato sobre la expresión de RANKL en los osteoblastos UMR106, como un posible mecanismo para la modulación de la formación y activación de osteoclastos. La incubación con 100 µg/ml AGEs produjo una inhibición (50 % respecto de BSA) en la expresión del RANKL por parte de los osteoblastos (Figura 2). El alendronato (10⁻⁸M-10⁻⁵M) indujo también una inhibición en la fluorescencia

TABLA I. Efecto de los AGEs y distintas concentraciones de alendronato sobre la actividad TRAP

Alendronato	0	10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁴ M
BSA 100 µg/ml	100±1	89±1**	89±2**	90±5*	75±2**	79±5**
AGEs 100 µg/ml	86±2**	83±3	81±3	80±2	69±3 [#]	69±3 [#]

Las células UMR106 se cocultivaron con los macrófagos Raw264.7 durante 8 días. Al cumplirse 4 días de cultivo se les agregó BSA o AGEs en presencia o ausencia de Alendronato en concentraciones crecientes (10⁻⁸M-10⁻⁴M) y se incubó hasta completar los 8 días de cultivo. Finalmente se evaluó la actividad TRAP por el método ya descrito. Los resultados se expresan como % basal y se presentan como la media ± SEM (*p<0.05, **p<0.001 respecto de BSA) ([#]p<0.001 respecto de AGEs)

TABLA II. Efecto de los AGEs y alendronato sobre el número de osteoclastos

Alendronato	0	10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁵ M
BSA 100 µg/ml	2.19±0.17	1.75±0.17*	0.73±0.12**
AGEs 100 µg/ml	0.96±0.12**	0.87±0.13**	0.62±0.09 [#]

Se evaluó el número promedio de osteoclastos por campo en las diferentes condiciones indicadas. Para ello se contaron las células con 3 o más núcleos en 50 campos a 400 x. Los resultados se expresaron como la Media ± SEM. (*p<0.05, **p<0.001 respecto de BSA) ([#]p<0.01 respecto de AGEs)

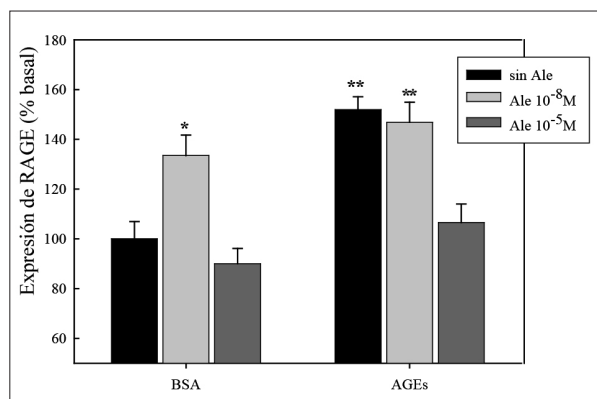


Figura 1. Determinación de RAGE en osteoclastos por IFI. Los cocultivos se incubaron con BSA o AGEs (100 µg/ml) en presencia o ausencia de Ale 10⁻⁸M o 10⁻⁵M. Luego se realizó el ensayo de inmunofluorescencia para RAGE. Se tomaron imágenes a 1000x, se cuantificó la fluorescencia de las mismas y se graficó como porcentaje del basal (BSA) (* p<0.05, ** p<0.001 respecto de BSA).

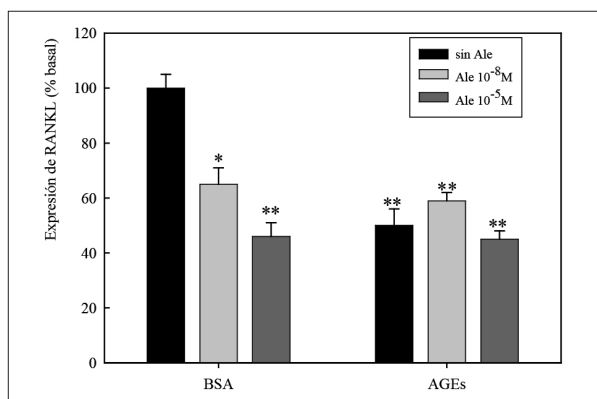


Figura 2. Determinación de RANKL en osteoblastos por IFI. Los osteoblastos UMR-106 se incubaron con BSA o AGEs (100 µg/ml) en presencia o ausencia de Ale 10⁻⁸M o 10⁻⁵M. Luego se realizó el ensayo de inmunofluorescencia para RANKL. Se tomaron imágenes a 1000x, se cuantificó la fluorescencia de las mismas y se graficó como porcentaje del basal (BSA) (* p<0.05, ** p<0.001 respecto de BSA).

asociada al RANKL en forma dosis dependiente (65-47 % respecto de BSA). Sin embargo, cuando los osteoblastos se co-incubaron con AGEs y alendronato (10⁻⁸M-10⁻⁵M), no se observó un efecto aditivo de este bifosfonato sobre la inhibición de la expresión del RANKL inducida por los AGEs (59-45 % respecto de BSA).

DISCUSIÓN

Los bifosfonatos son probablemente la familia de drogas antiosteoporóticas más ampliamente utili-

zada, y aunque su acción primaria tiene por objetivo principal inhibir la función y la supervivencia osteoclástica, también se ha demostrado que puede influir positivamente en el desarrollo osteoblástico y en el potencial de formación ósea⁽⁵⁻⁷⁾. El uso de BP en pacientes con osteopatías diabéticas no se encuentra resuelto en la actualidad, ya que los resultados obtenidos suelen ser contradictorios⁽⁸⁻⁹⁾.

Como los osteoclastos son blancos de acción de los BP, sus efectos y mecanismos de acción sobre este tipo celular son bien conocidos. Sin embargo, el efecto de los AGEs sobre los osteoclastos no está aún completamente dilucidado y las evidencias que se han obtenido son controversiales⁽¹⁰⁾. Solo dos grupos han estudiado el efecto de los AGEs sobre osteoclastos, el grupo de Miyata en 1997 y el grupo de Valcourt diez años después.

Miyata y col.⁽¹¹⁾ encontraron un aumento en el número de los *pits* o lagunas de resorción cuando los osteoclastos eran cultivados sobre cortes delgados de dentina modificada por AGEs. Para estos estudios, los autores utilizaron cultivos *in vitro* de células de médula ósea de ratón no fraccionadas conteniendo osteoclastos. No hubo aumento en el número de osteoclastos formados *de novo*, indicando un aumento en la actividad de los osteoclastos existentes. El aumento en la resorción ósea inducida por los AGEs, fue apoyada *in vivo* demostrando que partículas óseas modificadas por AGEs eran resorbidas en mayor extensión que las partículas controles no glicadas, cuando se implantaron subcutáneamente.

En contraste, el trabajo de Valcourt⁽³⁾ mostró un efecto opuesto al que encontró Miyata, en un estudio *in vitro* usando osteoclastos maduros de conejo y de origen humano. Ellos demostraron que el proceso de resorción se inhibía fuertemente cuando los osteoclastos maduros se plaqueaban sobre cortes delgados de marfil conteniendo pentosidina, una estructura AGEs bien caracterizada. Esta inhibición de la resorción ósea fue confirmada por una marcada reducción de la liberación de fragmentos de colágeno tipo I generados por las enzimas colagenolíticas secretadas por los osteoclastos, hacia el medio de cultivo de las matrices mineralizadas modificadas por AGEs. Este efecto es, probablemente, el resultado de una disminución de la solubilidad de las moléculas de colágeno modificadas por AGEs.

En el presente trabajo observamos que los AGEs inhibieron en forma dosis dependiente el proceso de diferenciación osteoclástica, encontrando una marcada disminución en la actividad TRAP, así

como en el número de células multinucleadas desarrolladas en presencia de AGEs. Estos resultados concuerdan con las observaciones realizadas por el grupo de Valcourt⁽³⁾ utilizando la línea celular monocítica Raw 264.7 y monocitos humanos primarios, aunque diferenciados a osteoclastos en presencia de RANKL recombinante.

Una vez evaluado el efecto de los AGEs, investigamos el posible efecto del agregado de diferentes dosis de alendronato en coincidencia con los AGEs, sobre la diferenciación de los osteoclastos. Como resultado de estos experimentos, encontramos que bajas dosis de alendronato (10^{-8}M – 10^{-6}M) indujeron una inhibición significativa, y similar a la inhibición producida por los AGEs, sobre la actividad de TRAP de cocultivos desarrollados en presencia de BSA. Por el contrario, en presencia de AGEs no se observó una inhibición adicional del alendronato a bajas dosis, respecto de la ya producida por los AGEs. Estos efectos fueron reproducidos por bajas dosis de otros BP nitrogenados como el Zoledronato y Pamidronato (datos no presentados). Así, podríamos sugerir que los BP nitrogenados a bajas concentraciones disminuyen la actividad de TRAP en condiciones basales (BSA) pero no afectan posteriormente la acción inhibitoria de los AGEs sobre esta actividad.

Por otro lado, altos niveles de alendronato (10^{-5}M – 10^{-4}M) inhibieron la actividad TRAP en forma significativa. De esta manera, parecería haber un pequeño efecto aditivo sobre la inhibición de TRAP observada en presencia de AGE y altas dosis de alendronato.

Al evaluar la acción del alendronato sobre el número de osteoclastos vimos que indujo una disminución significativa y dosis dependiente, la cual fue más marcada a concentraciones altas (10^{-5}M). Por otro lado, mientras que el agregado de bajas dosis de alendronato en presencia de AGEs, no indujo un efecto adicional sobre la inhibición producida por los AGEs sobre el número de osteoclastos, este efecto aditivo inhibitorio sí ocurrió a altas concentraciones de alendronato (10^{-5}M).

En resumen, la coincidencia de AGEs y altas concentraciones de alendronato, potencia la inhibición del desarrollo osteoclástico que observamos para cada uno de los agentes por sí solo.

Extrapolando a una situación "in vivo", estas condiciones podrían ser análogas a las que encontrarían los osteoclastos de un individuo con diabetes descompensada. Así, en sus lagunas de resorción los osteoclastos estarían expuestos si-

multáneamente a concentraciones de BP cercanos a 10^{-4}M ⁽¹²⁾, así como a elevadas cantidades de AGEs presentes tanto sobre la matriz extracelular (MEC) ósea glicada, como sobre péptidos provenientes de la acción degradativa de proteasas osteoclásticas (como la catepsina K) sobre dicha MEC.

Aunque los mecanismos siguen siendo desconocidos, se ha sugerido que los AGEs pueden interferir con la diferenciación de los osteoclastos y con su actividad resorptiva a través de la interacción con receptores específicos de superficie celular (3). Tanto los progenitores de los osteoclastos como los osteoclastos maduros expresan diferentes receptores para AGE, incluyendo al RAGE (receptor de AGE). Adicionalmente la importancia de la interacción de AGEs y su receptor RAGE en la maduración de osteoclastos y su función, ha sido demostrada por Zhou y col.⁽¹³⁾. Estos autores sugieren que la interacción de los AGEs con el RAGE tendría importantes consecuencias sobre la remodelación ósea. Basado en estas observaciones, en este trabajo investigamos la expresión y localización de RAGE en los osteoclastos murinos por inmunofluorescencia indirecta.

El RAGE fue detectado en bajos niveles en las células multinucleadas generadas bajo condiciones basales (BSA). Similarmente a lo descrito para otros sistemas, en el presente trabajo la incubación de osteoclastos maduros en presencia de AGEs indujo un incremento en la expresión de RAGE (50 % de aumento respecto de BSA no glicado).

Por otro lado, nos preguntamos si bajas dosis de alendronato, que ejercen un efecto similar al de los AGEs sobre osteoclastos, podrían afectar la expresión del RAGE. Encontramos que alendronato 10^{-8}M indujo un incremento significativo en la fluorescencia asociada al RAGE de los osteoclastos incubados bajo condiciones basales (BSA). Por el contrario, altas dosis de alendronato no modificaron la expresión del RAGE bajo condiciones basales, presentando una intensidad de fluorescencia similar al control con BSA.

Finalmente, la adición de bajas dosis de alendronato en presencia de AGEs no alteró la "up-regulation" del RAGE inducida por los AGEs. Sin embargo, cuando los osteoclastos se incubaron con AGEs y alendronato 10^{-5}M , esta dosis del BP bloqueó el efecto estimulante de los AGEs sobre la expresión de su receptor RAGE e indujo una disminución en la fluorescencia asociada al RAGE.

En conjunto los resultados obtenidos en los osteoclastos sugieren que a bajas dosis de alendronato, su efecto inhibitorio podría ser mediado parcialmente por cambios en la expresión de RAGE. Por otro lado en presencia de AGEs, altas concentraciones de alendronato ejercen un efecto inhibitorio independiente del receptor RAGE.

En otros experimentos con osteoblastos UMR106, pudimos demostrar que el alendronato redujo en forma dosis dependiente la expresión de RANKL. Este hecho concuerda con lo encontrado por otros autores, quienes hallaron que los BP inducen una reducción en la expresión de RANKL en osteoblastos humanos, así como en osteoblastos de rata⁽¹⁴⁻¹⁶⁾.

Eslami y col.⁽¹⁷⁾ realizaron un estudio con células de médula ósea de pacientes que recibieron tratamiento con alendronato, y vieron que tanto el número de osteoclastos diferenciados como la expresión de RANKL disminuyeron marcadamente en las células provenientes de pacientes con tratamiento, respecto a los pacientes control. Otros estudios han demostrado que cuando la terapia con bifosfonatos se prolonga durante más de un año, el número de los precursores osteoclásticos circulantes se reduce, y se especula que esta reducción está asociada a una disminución de los niveles séricos de RANKL⁽¹⁸⁻¹⁹⁾. Estos hallazgos muestran que el alendronato tiene efectos inhibitorios sobre la diferenciación de los osteoclastos, además de su conocida acción para promover la apoptosis de los osteoclastos maduros.

Hemos demostrado en el presente trabajo que los AGEs afectan la formación y diferenciación de osteoclastos "in vitro". Por otra parte, se ha demostrado previamente que los AGEs inhiben la proliferación y diferenciación osteoblásticas⁽²⁰⁻²¹⁻²⁴⁾. Sabiendo que la osteoclastogénesis está íntimamente ligada a la diferenciación de osteoblastos, es tentador especular que los AGEs también podría inhibir la diferenciación osteoclástica de forma indirecta, mediante la inhibición de la diferenciación de los osteoblastos y de su posterior expresión de RANKL.

Se ha planteado a la osteopatía diabética como una patología de origen adinámico, en la cual coexiste una disminución de la densidad mineral ósea con menor calidad del hueso, en este último caso por disminución del remodelado lo cual genera una acumulación de imperfecciones y mayor propensión a fracturas de bajo trauma. Los efectos de

los AGEs que hemos descrito previamente –y en este trabajo– sobre células de hueso, contribuirían doblemente a la disminución del remodelado, ya que deprimirían simultáneamente la formación osteoblástica y la resorción osteoclástica. Adicionalmente, hemos encontrado que estas acciones de los AGEs pueden ser modulados, al menos "in vitro", por BP como el alendronato. En trabajos previos⁽²⁴⁾ demostramos que el alendronato podía prevenir los efectos deletéreos de los AGEs sobre osteoblastos en cultivo. Por otro lado, nuestros resultados actuales confirman el efecto antiresortivo del alendronato, y además muestran que concentraciones de este BP similares a las que se encuentran en las lagunas de resorción, potencian "in vitro" el efecto inhibitorio de los AGEs sobre la formación y maduración de osteoclastos. Si nuestros resultados pasados y presentes pudieran extrapolarse a una situación clínica, estarían indicando que el alendronato se opondría a los efectos de los AGEs sobre osteoblastos, pero a la vez potenciaría los efectos de los AGEs sobre osteoclastos. Esta dualidad de acción del BP sobre uno de los potenciales mecanismos patogénicos de la osteopatía diabética como es la acumulación de AGEs, probablemente sea la causa de los resultados contradictorios que se han encontrado en pacientes con Diabetes Mellitus en tratamiento con alendronato.

CONCLUSIONES

En conclusión, tanto los AGEs como el alendronato inhiben el número y diferenciación (actividad TRAP) de osteoclastos en cultivo, con un efecto aditivo entre ambos a altas concentraciones de alendronato. Si estos resultados *in vitro* fueran extrapolables a un entorno clínico, podrían estar indicando una potenciación del efecto antiresortivo del alendronato, en el contexto de una matriz extracelular ósea sobremodificada por AGEs como podría ocurrir en un paciente con Diabetes Mellitus.

Asimismo, tanto AGEs como bajas dosis de alendronato aumentan la expresión del receptor RAGE en osteoclastos, lo cual se correlaciona con su inhibición del desarrollo osteoclástico. En osteoblastos en cultivo, los AGEs y el alendronato reducen la expresión de RANKL, lo cual podría también explicar parcialmente los efectos inhibitorios de estos agentes sobre el reclutamiento y la maduración de osteoclastos.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Bouillon R.** Diabetic bone disease. *Calcif. Tissue Int.* 49:155-160, 1991
2. **Hein G, Wiegand R, Lehmann G, Stein G, Franke S.** Advanced glycation end-products pentosidine and N^ε-carboxymethyllysine are elevated in serum of patients with osteoporosis. *Rheumatology* 42:1242-1246, 2003
3. **Valcourt U, Merle B, Gineyts E, Viguet-Carrin S, Delmas PD, Garnero P.** Non-enzymatic glycation of bone collagen modifies osteoclastic activity and differentiation. *J Biol Chem.* 282:5691-5703, 2007
4. **Nicolin V, Baldini G, Bareggi R, Zweyer M, Zauli G, Vaccarezza M, Narducci P.** Morphological features of osteoclasts derived from a co-culture system. *J Mol Hist.* 37:171-177, 2006
5. **Tsuchimoto M, Azuma Y, Higuchi O, Sugimoto I, Hirata N, Kiyoki M.** Alendronate modulates osteogenesis of human osteoblastic cells in vitro. *Jpn. J. Pharmacol.* 66:25-33, 1994
6. **Plotkin LI, Weinstein RS, Parfitt AM, Roberson PK, Manolagas SC, Bellido T.** Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *J Clin Invest.* 104:1363-1374, 1999
7. **Viereck V, Emons G, Lauck V, Frosch KH, Blaschke S, Grundker C.** Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 291:680-686, 2002
8. **Dagdelen S, Sener D, Bayraktar M.** Influence of type 2 diabetes mellitus on bone mineral density response to bisphosphonates in late postmenopausal osteoporosis. *Adv Ther.* 24:1314-1320, 2007
9. **Yamauchi M.** World Health Organization. Absolute risk for fracture and WHO guideline. Treatment of patients with secondary osteoporosis. *Clin Calcium.* 17:1106-1113, 2007
10. **Saito M, Marumo K.** Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus. *Osteoporos Int.* 21:195-214, 2010
11. **Miyata T, Notoya K, Y Oshida K, Horie K, Maeda K, Kurokawa K, Taketomi S.** Advanced glycation end products enhance osteoclast-induced bone resorption in cultured mouse unfractionated bone cells and in rats implanted subcutaneously with devitalized bone particles. *J Am Soc Nephrol.* 8:260-270, 1997
12. **Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J, Frith JC.** Cellular and Molecular Mechanisms of Action of Bisphosphonates. *Cancer* 88:2961-2978, 2000
13. **Zhou Z, Immel D, Xi CX, Bierhaus A, Feng X, Mei L, Nawroth P, Stern DM, Xiong WC.** Regulation of osteoclast function and bone mass by RAGE. *J Exp Med.* 203:1067-1080, 2006
14. **Pan B, Farrugia A, To L, Findlay DM, Green J, Lynch K, Zannettino AC.** The nitrogen-containing bisphosphonate, zoledronic acid, influences RANKL expression in human osteoblast-like cells by activating TNF-alpha converting enzyme (TACE). *J Bone Miner Res.* 19:147-154, 2004
15. **Mackie P, Fisher J, Zhou H, Choong P.** Bisphosphonates regulate cell growth and gene expression in the UMR 106-01 clonal rat osteosarcoma cell line. *Br J Cancer* 84:951-958, 2001
16. **Kobayashi A, Hirano F, Makino I.** The inhibitory effect of bisphosphonates on glucocorticoid induced RANKL expression in human cells. *Scand J Rheumatol.* 34:480-484, 2005
17. **Eslami B, Zhou S, Van Eekeren I, LeBoff MS, Glowacki J.** Reduced Osteoclastogenesis and RANKL Expression in Marrow from Women Taking Alendronate. *Calcif Tissue Int.* 88:272-280, 2011
18. **D'Amelio P, Grimaldi A, Di Bella S, Tamone C, Brianza SZ, Ravazzoli MG, Bernabei P, Cristofaro MA, Pescarmona GP, Isaia G.** Risedronate reduces osteoclast precursors and cytokine production in postmenopausal osteoporotic women. *J Bone Miner Res.* 23:373-379, 2008
19. **D'Amelio P, Grimaldi A, Cristofaro MA, Ravazzoli M, Molinatti PA, Pescarmona GP, Isaia G.** Alendronate reduces osteoclast precursors in osteoporosis. *Osteoporos Int.* 10.1007/s00198-009-1129-1, 2009
20. **Katayama Y, Celic S, Nagata N, Martin TJ, Findlay DM.** Nonenzymatic glycation of type I collagen modifies interaction with UMR 201-10B preosteoblastic cells. *Bone* 21:237-242, 1997
21. **McCarthy AD, Etcheverry SB, Cortizo AM.** Advanced glycation endproduct specific receptors in rat and mouse osteoblast-like cells: regulation with stages of differentiation. *Acta Diabetol.* 36:45-52, 1999
22. **McCarthy AD, Etcheverry SB, Bruzzone L, Lettieri G, Barrio DA, Cortizo AM.** Non-enzymatic glycosylation of a type I collagen matrix: effects on osteoblastic development and oxidative stress. *B.M.C. Cell Biol.* 2:16, 2001
23. **Kume S, Kato S, Yamagishi S, Inagaki Y, Ueda S, Arima N, Okawa T, Kojiro M, Nagata K.** Advanced glycation end-products attenuate human mesenchymal stem cells and prevent cognate differentiation into adipose tissue, cartilage, and bone. *J Bone Miner Res.* 20:1647-1658, 2005
24. **Gangoiti MV, Cortizo AM, Arnol V, Felice JI, McCarthy AD.** Opposing effects of bisphosphonates and advanced glycation end-products on osteoblastic cells. *Eur J Pharmacol.* 600:140-147, 2008