

# ADAPTACIÓN DEL ENSAYO DE REABSORCIÓN OSTEOCLÁSTICA UTILIZANDO EL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO AMBIENTAL

E. ENGEL LÓPEZ\*, X. NOGUÉS SOLÁN\*, J. CONDEMINES CASTELLA\*, J.M. MANERO PLANELLA\*\*, J.A. PLANELL ESTANY\*\*, L. PÉREZ-EDO\*\*\*, D. ROTÉS SALA\*\*\*, A. DÍEZ-PÉREZ\*, S. SERRANO FIGUERA\* Y J. CARBONELL ABELLÓ\*

\*URFOA, INSTITUTO MUNICIPAL DE INVESTIGACIÓN MÉDICA. HOSPITAL DEL MAR. BARCELONA. \*\*DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LOS MATERIALES, ETSEIB, UPC. BARCELONA. \*\*\*HOSPITAL DE LA ESPERANZA. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA. BARCELONA.

Los ensayos de actividad osteoclástica son muy útiles para poder desarrollar trabajos sobre la fisiología de estas células y su comportamiento *in vitro* frente a fármacos, cambios fisiológicos, comunicación celular, etc. Un inconveniente para este tipo de ensayos es la duración del procedimiento, que requiere una gran inversión de tiempo que a veces no se ve recompensada por los resultados obtenidos. Con el objetivo de mejorar el procedimiento mediante la reducción del tiempo empleado y la obtención de unos mejores resultados se propone la utilización del microscopio electrónico de barrido (ESEM). Mediante la utilización del ESEM se han obtenido imágenes de mayor nitidez de las células y de su actividad.

Como conclusión, podemos decir que la aplicación de este procedimiento simplifica la metodología de trabajo y se obtienen mejores resultados en los ensayos de actividad osteoclástica.

**PALABRAS CLAVE:** *osteoclastos, ensayo de reabsorción, microscopía electrónica de barrido ambiental.*

*Osteoclasts resorption assays have been very useful to study these cells physiology and their behaviour in front of drugs, physiology changes, cell communication, etc. However, these studies take a long time and sometimes it is difficult to obtain relevant results. The aim of this work is to propose the use of the Environmental scanning electronic microscopy to show better and more clear results, and accelerate the cell count process. Applying this method, we have obtained good images of the cells and their activity, and the methodology becomes easier than previous method.*

**KEY WORDS:** *Osteoclasts, resorption assay, environmental scanning electronic microscopy.*

## INTRODUCCIÓN

Los osteoclastos son bien conocidos por su importante papel como células reabsorptivas que intervienen en el remodelado óseo<sup>1</sup>. Estas células multinucleadas de origen hematopoyético<sup>2-5</sup> se forman a partir de la fusión de precursores mononucleares, bajo la influencia de factores secretados por células estromales<sup>6</sup>. Los factores estimuladores de la formación de osteoclastos son, entre otros, la hormona paratiroidea (PTH), el colecalciferol ( $1\alpha 25$  (OH) $_2$ D $_3$ ), las interleucinas 1 (IL-1), 6 (IL-6), 11 (IL-11), el factor de necrosis tumoral (TNF) y las prostaglandinas (PG).

Los osteoclastos son células poco abundantes, entre 2 ó 3 por  $\mu\text{m}^3$ , exceptuando en las zonas donde hay un remodelado óseo activo<sup>7</sup>. Además, se encuentran fuerte-

mente adheridos a la matriz, presentan un gran tamaño y un alto contenido en enzimas proteolíticas, lo que las convierte en células frágiles y difíciles de cultivar en el laboratorio. Esto, sumado a la inexistencia de líneas celulares inmortales, ha provocado que durante años se haya trabajado para desarrollar un método eficaz con el que llevar a cabo experimentos *in vitro* utilizando estas células.

Diversos investigadores han desarrollado métodos de cultivo a partir de huesos de ratones, gallinas o conejos postnatales, en los que es posible obtener un alto número de osteoclastos<sup>8</sup>. En nuestro laboratorio de la *Unitat de Recerca de Fisiopatologia Ossia i Articular* (URFOA) hemos desarrollado un ensayo de reabsorción ósea utilizando el método de Boyde et al<sup>9,10</sup> modificado para adaptarlo al cultivo de osteoclastos humanos. La principal dificultad cuando se trabaja con muestras humanas es que el número de osteoclastos que pueden obtenerse es menor que cuando se utilizan animales. A esto debemos añadirle que las muestras provienen de individuos de edad avanzada, en los que el remodelado óseo está claramente disminu-

do, y por tanto el número de células es menor. Es por ello que nuestro método se basa principalmente en la obtención de células osteoclásticas a partir de precursores de médula ósea.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### CULTIVO CELULAR

Para el aislamiento de las células se utilizan fragmentos de hueso esponjoso residual procedente de pacientes sometidos a remplazo ortopédico. Se elimina el tejido cortical de las muestras y se lava con alfa-modified Eagle's medium (alfa-MEM) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (FCS) y antibióticos. Los osteoclastos adheridos al tejido óseo y los precursores de la médula ósea se disocian por separación mecánica, lavando vigorosamente los fragmentos de hueso con una jeringuilla o una pipeta. Se lavan las células por centrifugación dos veces, 5 minutos a 1.000 rpm. Se cuentan y se ponen a cultivar sobre láminas de dentina. Se utilizan láminas de dentina humana de un grosor entre

Correspondencia: X. Nogués Solán. Servicio de Medicina Interna. Hospital del Mar. Passeig Maritim, 25-29. 08003 Barcelona. e-mail 85382@imas.imim.es

Aceptado para su publicación el 22-8-2000

300-450  $\mu\text{m}$ , en las que los restos de materia orgánica se han eliminado por ultrasonidos. La suspensión celular se deposita sobre las láminas durante 150 minutos, que es el tiempo necesario para que se peguen las células adherentes. Se retira el medio y se pone medio fresco suplementado con un 10% de FCS y  $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ . El medio se cambia periódicamente y se dejan crecer las células durante tres semanas.

## RECUESTO CELULAR

Para realizar la observación y el recuento de las células se utiliza un microscopio electrónico de barrido ambiental (ESEM) (Electroscan 2020, Boston, USA). Para ello, se retira el medio de cultivo y se lavan las células con PBS. Las células se fijan durante 5 minutos con paraformaldehído al 4%. Una vez contados los osteoclastos, las láminas de dentina se sonicen para despegar las células, en un baño de ultrasonidos con agua oxigenada. La dentina se recubre de oro para obtener las imágenes de las lagunas de reabsorción por microscopía de barrido convencional (MEB) (Jeol JSM 6400, Japón), que luego serán analizadas con un analizador de imágenes.

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos tras la utilización del método descrito permiten, después de siete días de cultivo, la observación de células multinucleadas, que presentan una membrana citoplasmática con bordes ondulados, típicos de estas células. En la figura 1 se muestran osteoclastos vistos por microscopía óptica. Los núcleos se dispo-

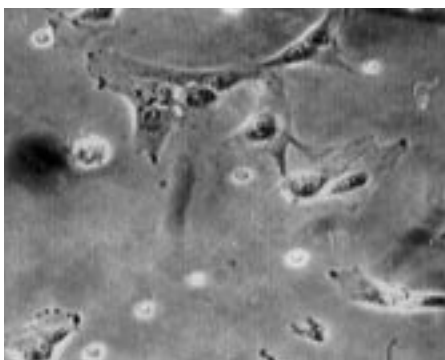


Figura 1. Osteoclastos observados con microscopía óptica a 32X.

nen en grupos, algunos quedando en el centro del citoplasma celular y otros junto a la membrana plasmática. Estas células son positivas para la fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP).

En los cultivos mantenidos durante 21 días y procesados para microscopía electrónica de barrido se pueden observar células de gran tamaño. En la figura 2 podemos observar también con ESEM un osteoclasto con su correspondiente laguna de reabsorción. En la figura 3 se aprecia la unión de dos células, fusión que da lugar a estas células multinucleadas. Cuando sonicamos las láminas de dentina con hidróxido peróxido para despegar las células podemos observar las lagunas excavadas por los osteoclastos como resultado de su actividad reabsorptiva, como se muestra en la figura 4.

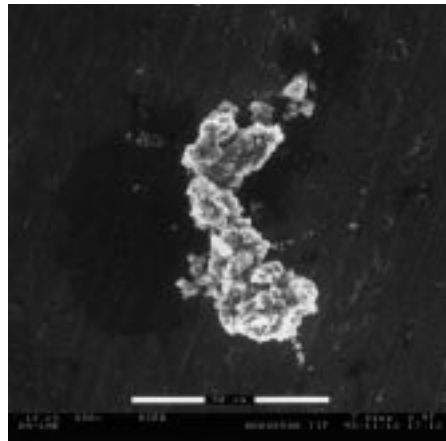


Figura 2. Osteoclasto observado a 800X, con ESEM sobre la lámina de dentina. Por debajo de la célula se puede apreciar la laguna de reabsorción excavada por la misma.

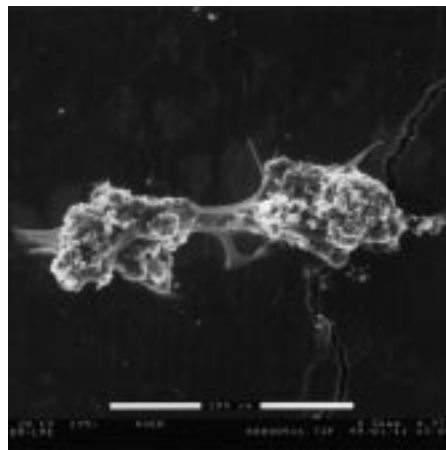


Figura 3. Osteoclastos adheridos a la dentina, después de 21 días de cultivo, observados al microscopio de barrido ambiental (ESEM) a 225X. Se observa como ambas células se encuentran en contacto por los podosomas.

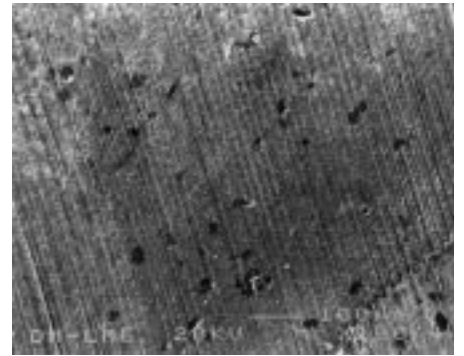


Figura 4. Lagunas de reabsorción sobre la lámina de dentina, una vez despegadas las células, observadas al microscopio electrónico de barrido (MAB) a 100X.

## DISCUSIÓN

En la investigación con osteoclastos uno de los mayores avances ha sido el método de cultivo desarrollado por Boyde et al<sup>9,10</sup> para realizar estudios de reabsorción sobre sustratos mineralizados a partir de osteoclastos aislados. Este método ha sido utilizado con éxito para evaluar el efecto de las hormonas, citocinas y pH sobre la actividad osteoclástica<sup>11-14</sup>. Este método de aislamiento presenta varias ventajas: en primer lugar es un método relativamente sencillo, en el que se limitan las manipulaciones del cultivo; y en segundo lugar permite obtener células osteoclásticas maduras con actividad reabsorptiva a partir de muestras humanas, en las que el número de células que se pueden obtener es significativamente menor que cuando se utilizan muestras de animales, sobre todo si se trabaja con individuos fetales o postnatales de pocos días.

La utilización del microscopio electrónico de barrido para identificar y evaluar las lagunas de reabsorción ha permitido mejorar los resultados visuales, ya que pueden obtenerse unas imágenes de gran calidad. Aun así, presenta el problema de la preparación de las muestras, que resulta largo y engorroso. El tratamiento de las muestras para poder ser procesadas requiere al menos dos días. Si además se quiere realizar un conteo celular previo y obtener imágenes de las células utilizando la misma muestra el tiempo se alarga, y corremos el riesgo de estropear e incluso quebrar las láminas de dentina, que son extremadamente frágiles. Para obviar este hecho y mejorar la técnica hemos puesto a punto, por primera vez, la utilización del

ESEM para la observación de estas células. La utilización del mismo, Elestroscan 2020, permite la observación de las muestras fijando los cultivos únicamente con paraformaldehído y observar las células a una presión de cámara prácticamente igual a la ambiental, lo que permite que las células mantengan su morfología intacta. De esta forma se minimizan los procesos de preparación de la muestra previos a su observación, tales como la deshidratación, fijación, punto crítico y recubrimientos conductores que se requieren en microscopía convencional, los cuales son procesos largos y tediosos. Y por último, permite el recuento del número de células y la evaluación de las zonas reabsorbidas sobre la misma lámina de dentina en un tiempo relativamente corto.

En conclusión, creemos que este es un buen método para la realización de ensayos de reabsorción y para poder evaluar la actividad de los osteoclastos humanos *in vitro*, aplicándolo al estudio de enfermedades que afectan al metabolismo óseo.

Este trabajo ha sido financiado por el Fondo de Investigación Sanitaria, proyecto número 98,0412.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Mundy GR, Roodman GD. Osteoclast ontogeny and function. En: Peck WA ed. Bone and Mineral Research. Amsterdam: Elsevier, 1987; 209.
2. Baron R. Molecular mechanisms of bone resorption by the osteoclast. *Anat Rec* 1989; 224: 317-324.
3. Roodman GD. Advances in bone biology: The osteoclast. *Endocr Rev* 1996; 17: 308-332.
4. Suda T, Udagawa N, Takahashi N. Cells of bone: Osteoclast generation. En: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. Principles of Bone Biology. San Diego: Academic Press, 1996; 87-102.
5. Athanasou NA. Cellular biology of bone-resorbing cells. *J Bone Joint Surg* 1996; 78-A: 1.096-1.112.
6. Suda T, Nakamura I, Jimi E, Takahashi N. Regulation of osteoclast function. *J Bone Miner Res* 1997; 12: 869-896.
7. Menuier PJ, Coindre JM, Edouard CM, Arlot ME. Bone histomorphometry in Paget's disease. *Arthritis Rheum* 1980; 23: 1.095-1.103.
8. Chambers TJ, Revell PA, Fuller K, Athanasou NA. Resorption of bone by isolated rabbit osteoclasts. *J Cell Sci* 1984; 66: 383-399.
9. Jones SJ, Boyde A, Ali NN. The resorption of biological and non-biological substrates by cultured avian and mammalian osteoclasts. *Anat Embryol* 1984; 170: 247-256.
10. Jones SJ, Ali NN, Boyde A. Survival and resorptive activity of chick osteoclasts in culture. *Anat Embryol* 1986; 174: 265-275.
11. Chambers TJ, McSheehy PMJ, Thomson BM, Fuller K. The effect of calcium-regulating hormones and prostaglandins on bone resorption by osteoclasts disaggregated from neonatal rabbit bones. *Endocrinology* 1983; 116: 234.
12. Arnett TR, Dempster DW. A comparative study of disaggregated chick and rat osteoclasts in vitro: Effect of calcitonin and prostaglandins. *Endocrinology* 1987; 120: 602.
13. Thomson BM, Saklatvala J, Chambers TJ. Osteoclasts mediate interleukin 1 stimulation of bone resorption by rat osteoclasts. *J Exp Med* 1986; 164: 104.
14. Arnett TR, Dempster DW. Effect of pH on bone resorption by rat osteoclasts in vitro. *Endocrinology* 1986; 119: 119.

## NOTICIAS

### 8º CONGRESO SEIOMM

26-28 de septiembre de 2001. Ciutadella, Menorca

Información general

Presidente Comité Organizador Local: Dr. Pau Lluçh Mesquida

Secretaría Técnica: Rosa Diez

Secretaría SEIOMM

Passeig Marítim, 25-29. 08003 BARCELONA

Tel. 93 248 31 24 – Fax: 93 221 62 92 – email: 85382@imas.imim.es