

Estudio de la expresión de factores óseos en el hueso murino ante la falta de pleiotrofina y sus cambios en la situación inflamatoria

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2020000300005>

Portal-Núñez S¹, Messa L¹, Sevillano J², Herradón G³, Ramos MP², Gortazar AR¹

1 Instituto de Medicina Aplicada. Departamento de Ciencias Médicas Básicas. Facultad de Medicina

2 Departamento de Química y Bioquímica. Facultad de Farmacia

3 Departamento de Ciencias Farmacéuticas y de la Salud. Facultad de Farmacia

Universidad San Pablo-CEU. Madrid (España)

Fecha de recepción: 07/09/2020 - Fecha de aceptación: 24/11/2020

Trabajo remitido como prestación por la beca FEIOMM de Investigación Traslacional 2015

Resumen

La pleiotrofina (PTN) es un péptido implicado en el desarrollo y el mantenimiento del tejido óseo, y con importantes funciones en los procesos inflamatorios. Sin embargo, la delección de la PTN en modelos murinos no produce un deterioro óseo significativo, sin que hasta la fecha se hayan estudiado los mecanismos que compensan su pérdida. Con este estudio quisimos comprobar cómo afecta la delección de PTN y la inflamación aguda a la expresión de factores óseos. Para ello empleamos ratones hembra de tres meses deficientes para la PTN (PTN^{Ko}) a las que indujimos una inflamación aguda por administración de lipopolisacárido (LPS). Se aislaron las vértebras y las tibias para poder medir la expresión de genes y realizar un recuento de osteocitos. En cultivos celulares comprobamos si la PTN podía proteger a células MC3T3 (osteoblásticas) y MLOY4 (osteocitos) de la inducción de muerte celular producida por etopósido. Nuestros resultados muestran que la expresión de osteocalcina está incrementada en las vértebras de los ratones PTN^{Ko}, y que la inflamación produjo el incremento de expresión de podoplanina (E11), conexina 43 (Cox43) y el péptido relacionado con la parathormona (PTHrP) en los ratones PTN^{Ko} tratados con LPS. La administración de PTN redujo de manera significativa la muerte inducida por etopósido en cultivos de células MC3T3 y MLOY4. En conclusión, la deficiencia de PTN indujo un aumento de la expresión de OCN, y la inflamación aguda produjo la sobreexpresión de E11, PTHrP, y Cox43 en ratones PTN^{Ko}. La PTN aumentó la viabilidad de células osteoblásticas y osteocitos frente al tratamiento con etopósido.

Palabras clave: pleiotrofina, homeostasis ósea, modelo murino.

INTRODUCCIÓN

La pleiotrofina (PTN) es una citoquina secretada por múltiples tejidos durante el desarrollo embrionario, y que en edades adultas se expresa de manera abundante en el cerebro y en el hueso^{1,2}. La PTN está compuesta por 136 aminoácidos y su secuencia es muy rica en lisina y cisteína. Esta citoquina constituye junto a la midquina (Mdk), con quien comparte un 50% de homología, la familia de los factores de crecimiento y diferenciación de unión a heparina, teniendo ambas afinidad por la matriz extracelular ósea³⁻⁵. La PTN también es conocida como el factor estimulante de osteoblastos 1 (OSF-1) o factor de crecimiento unido a heparina (HB-GAM)⁶. Esta citoquina fue aislada inicialmente

de los tejidos óseos y neuronales de ratas recién nacidas^{2,7,8} y posteriormente se han encontrado sus homólogos en muchas especies incluido el ser humano, siendo de un 90% la homología entre las distintas especies^{9,10}.

Se ha descrito que la PTN ejerce sus efectos a través de su unión a los glucosamin-glucanos de varios receptores como el N-sindecano, también llamado sindecano^{3,11}, los sindecanos 1 y 4¹², la integrina $\alpha_v\beta_3$ ¹³ y el receptor proteína tirosina fosfatasa beta/zeta (PTRP β/ζ)¹⁴. También se ha postulado que la nucleolina pueda ser un receptor de baja afinidad de PTN¹⁵ y que la quinasa del linfoma anaplásico (ALK) puede tener alguna función en la señalización de PTN¹⁶.



Correspondencia: Sergio Portal Núñez (sergio.portalnunez@ceu.es)

Probablemente el receptor mejor estudiado de PTN y que además se ha demostrado que se expresa en osteoblastos¹⁷, es PTRPβ/ζ. Este receptor es una proteína tirosina fosfatasa cuya activación por parte de PTN produce su desestabilización y, por tanto, el cese en su actividad fosfatasa. Esto desencadena el aumento de fosforilación de sus sustratos (*e.g.* fyn-quinasa) dando lugar, entre otros efectos, a la activación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFκβ)¹⁸. Recientemente se ha confirmado la presencia de este receptor en el tejido óseo y su activación a través de PTN y de otro ligando, como es la proteína de unión 2 del factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP-2)¹⁹. Por otro lado, también se ha demostrado la expresión de N-sindecano en osteoblastos y su relación con la regeneración ósea⁶. En este caso la unión de PTN a N-sindecano produciría la fosforilación de src, lo que a su vez daría lugar a reorganizaciones en el citoesqueleto celular que permitirían un aumento de la migración celular²⁰.

Entre sus las funciones más destacadas de la PTN, está su papel como promotor de la angiogénesis y de la migración de células endoteliales^{13,21}, el crecimiento de las neuritas²² y su papel modulador de los procesos inflamatorios gobernados por la microglia en el sistema nervioso central²³. Las funciones de PTN en el tejido óseo son diversas. Así, se ha descrito que PTN es capaz de inducir la proliferación de células osteoblásticas de manera dependiente a su concentración y a la expresión de sus receptores²⁴, promueve la diferenciación de células mesenquimales a condrocitos durante el desarrollo óseo²⁵, y aumenta la migración y la adhesión a la matriz extracelular de células óseas^{6,26}. De hecho, se ha investigado el papel de la PTN en relación con la masa ósea realizando experimentos de delección o sobreexpresión del gen en modelos murinos. En el primer caso, se ha encontrado que la ausencia del gen no produjo un descenso en la masa ósea ni cambios significativos en las propiedades biomecánicas de estos huesos²⁷. Estudios posteriores también encontraron que la estructura ósea de los ratones sin PTN no se veía alterada, pero que había un retraso en la maduración ósea en ratones de 2 meses de edad²⁸.

También se ha estudiado del papel de la PTN en la mecanotransducción osteocitaria con diferentes resultados. En estudios *in vitro* se ha determinado que la carga mecánica conduce a una disminución de la expresión de PTN en las células óseas SaOs-2 y en osteoblastos primarios sometidos a este estímulo²⁹. Sin embargo, Imai y cols. demostraron que células MLOY-4 (línea celular de osteocitos), tratadas con carga mecánica incrementaban su producción de PTN²⁸. Estos datos están en consonancia con los hallados en un modelo animal de ratones hembra C57BL/6J sometidas a carga mecánica, en los que se produjo un aumento de la expresión de esta citoquina²⁹. Además, en el mismo estudio se demostró que la ausencia de PTN (usando un ratón con el gen de la PTN delecionado) no influía en el aumento de masa ósea producido por la carga mecánica.

Por otro lado, los efectos de la sobreexpresión de la PTN en el tejido óseo sí que parecen tener un efecto protector en situaciones de pérdida de masa ósea, como la ingravidez. Los ratones transgénicos para la PTN están parcialmente protegidos frente a la pérdida de masa producida por el estado de ingravidez al ser sometidos a una estancia en la estación espacial internacional, relacionándose esta protección con un aumento de actividad osteoblástica³⁰.

Dado que, como se ha comentado, la ausencia de PTN en hueso no parece influir de manera significativa en la estructura esquelética de los modelos murinos, en este trabajo nos propusimos averiguar cómo se alteraba la expresión de factores asociados con el mantenimiento correcto del metabolismo óseo en ausencia de PTN. Además, quisimos investigar cómo la expresión de estos genes estaba regulada ante una situación de inflamación aguda producida por inyección de LPS, tanto en presencia como en ausencia de PTN. Por último, comprobamos el efecto protector de la PTN en osteoblastos y osteocitos ante la presencia de un estímulo de muerte como es el etopósido.

MATERIAL Y MÉTODOS

Modelo animal

Se usaron ratones hembra de 3 meses deficientes en PTN (PTN^{Ko}) y con genotipo normal (WT) siendo el número de ratones empleados 9 para WT, 9 para PTN^{Ko} por grupo. Todos los ratones provenían de nuestro animalario, donde son criados de manera rutinaria. Para inducir un estado de inflamación aguda se inyectó por vía intraperitoneal una dosis de 7,5 mg/kg de lipopolisacárido 16 horas antes del sacrificio en 6 ratones WT y 5 ratones PTN^{Ko}. Los protocolos animales contaron con la aprobación del Comité de Bienestar Animal de la Universidad CEU-San Pablo y de la Consejería de Medio Ambiente de la Comunidad de Madrid, de acuerdo con el real decreto R.D. 53/2013 y la directriz europea 2010/63/EU.

Procesamiento de las muestras óseas y purificación del RNA

El RNA total fue extraído de las vértebras después de retirar los tejidos no óseos de las vértebras de las lumbares 1 a la 3, por medio de un pulverizador de tejido y por la disolución de este pulverizado en trizol (Invitrogen, Groningen, Holanda). El RNA fue extraído por medio de purificaciones por el método de clorformo:isoamílico (Sigma-Aldrich), seguido de precipitación con isopropanol, lavados posteriores con etanol al 70% y resuspensión en agua estéril libre de RNAsas. La retrotranscripción del ARN para obtener ADN complementario se llevó a cabo a partir de 2 µg de ARN usando el *cDNA High capacity cDNA reverse transcription kit* (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.) en un termociclador Eppendorf mastercycler, siguiendo el siguiente protocolo secuencial: 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C y 5 minutos a 85°C.

PCR cuantitativa

La PCR cuantitativa se realizó en un termociclador AB 7500 HD (Applied Biosystems). Usando sondas TaqMan MGB (Assay-by-Design™ System, Applied Biosystems) para medir la expresión de los siguientes genes: osteoprotegerina (OPG), ligando del receptor activador para el factor nuclear κB (RANKL), osteocalcina (OCN), péptido relacionado con la parathormona (PTHrP), podoplanina (E11), conexina 43 (Cox43), el receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular 2 (VEGFR2) y dickkopf-1 (Dkk1). Para producir la reacción de PCR se usó la polimerasa incluida en el kit *Taqman mastermix* (Applied Biosystems) aplicando el siguiente protocolo de 1 minuto a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C, recogiendo los datos de fluorescencia en cada paso de 60°C. La expresión de del gen 18S ribosomal fue usado como gen de referencia para normalizar la expresión.

La variación de expresión de cada uno de los genes en los diversos grupos se calculó con relación a la expresión obtenida en los ratones WT siguiendo la siguiente fórmula:

Expresión gen de interés = $2^{-\Delta\Delta Ct}$,
donde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ tratamiento - ΔCt basal^{31,32}. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

Contaje de osteocitos

Las tibias de los ratones fueron también extraídas en el momento de sacrificio y conservadas en formalina 10% para su posterior procesamiento histológico. Una vez procesadas y teñidas con hematoxilina-eosina, se realizó el conteo de los osteocitos embebidos en las trabéculas en 2 a 4 cortes no seriados correspondientes a la región inmediatamente inferior a la placa epifisaria de cada una de las tibias. El número de osteocitos se normalizó por su área correspondiente de tejido óseo calculada por medio del programa Image J (ImageJ 15.3a, *National Institutes of Health*, EE.UU.), y siguiendo las recomendaciones de la *American Society for Bone and Mineral Research*³³. El número de osteocitos resultantes se calculó haciendo la media de cada conteo por ratón, y se expresó como la media \pm error estándar de la media (EEM).

Cultivos de células *in vitro* y ensayo de viabilidad

Las células osteoblásticas murinas MC3T3-E1 se cultivaron en medio alfa MEM suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) (Sigma-Aldrich) y un 1% de penicilina-estreptomina. La línea estable de osteocitos murinos MLOY-4 fue mantenida en placas de cultivo previamente colagenizadas y con medio alfa MEM al 2,5% de suero de ternero (Sigma-Aldrich), 2,5% de FBS y 1% de penicilina-estreptomina. Ambas líneas celulares se incubaron a 17°C en una atmósfera con 5% de CO₂. Para los ensayos de viabilidad, ambas líneas celulares se incubaron en subconfluencia del 75% en placas de 6 pocillos y fueron pre-tratadas o no durante una hora con PTN (5,5 nM), y posteriormente incubadas en presencia de etopósido 50 μ M (agente apoptótico) en 1% de suero fetal bovino durante 48 horas. A las 48 horas se contaron las células incluyendo las que había en el sobrenadante de los pocillos y el tripsinizado de cada pocillo, y se hizo un recuento celular con Trypan Blue 0,4% en PBS en la cámara de Neubauer, distinguiendo las células vivas de las muertas. Se calculó el porcentaje de células muertas de cada uno de los experimentos. Se realizaron 3 experimentos con cada condición por triplicado y se expresó el resultado como la media \pm error estándar de la media (EEM).

Estadística

Los resultados se expresaron como media \pm error estándar de la media (EEM). La comparación entre varios grupos se realizó mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con test *a posteriori* de U Mann-Whitney si procedía. Se consideró una $p < 0,05$ como significativa. Los análisis se llevaron a cabo con el programa informático Graphpad InStat (San Diego, California, EE.UU.).

RESULTADOS

Expresión de genes en el tejido óseo en ausencia de PTN

En primer lugar, quisimos comprobar cómo variaba la expresión de genes relacionados con el metabolismo óseo en ausencia de PTN y en presencia de condiciones inflamatorias tras la administración de LPS. Entre la ex-

presión de todos los genes analizados encontramos que la OCN estaba sobreexpresada de manera muy significativa en los ratones PTN^{Ko} (Figura 1A). Sin embargo, la expresión de un marcador de diferenciación osteocítica temprano como es la podoplanina (E11) no sufrió cambios significativos (Figura 1B). De la misma manera, no sufrieron cambios significativos en el ratón PTN^{Ko} la expresión de los moduladores de la actividad osteoblástica y osteoclastica OPG y RANKL (Figuras 1C, 1D); el inhibidor de la vía Wnt, Dkk1 (Figura 1E); el VEGFR2 (Figura 1F); y los niveles de PTHrP (Figura 1G) y de Cox43 (Figura 1H). Por otro lado, cuando se trataron los ratones normales WT con LPS, encontramos que los niveles de OCN, Dkk-1 y VEGFR2 estaban significativamente disminuidos (Figuras 1A, 1D, 1F). Con respecto a los ratones PTN^{Ko} tratados con LPS encontramos un incremento significativo de la expresión de E11 (Figura 1B), PTHrP (Figura 1G) y Cox43 (Figura 1H) con respecto a los ratones WT tratados con LPS.

El número de osteocitos no sufrió cambios en ratones PTN^{Ko}, WT+LPS y PTN^{Ko}+LPS

Después de observar que el único gen cuya expresión estaba regulada era OCN, un gen relacionado con los estados muy avanzados de maduración osteoblástica³⁴, y que esta estaba regulada al alza, pensamos que esta expresión podía reflejar un aumento del número de osteocitos en los ratones PTN^{Ko} (ampliamos también este conteo a los grupos WT y PTN^{Ko} tratados con LPS). Para ello teñimos las tibias aisladas de los ratones y realizamos un conteo exhaustivo de los osteocitos que se hallaban en las secciones de hueso tibial. Como se puede apreciar en las figuras 2A, 2B, el número de osteocitos fue similar en todos los grupos de ratones, no hallándose diferencias significativas en ningún caso.

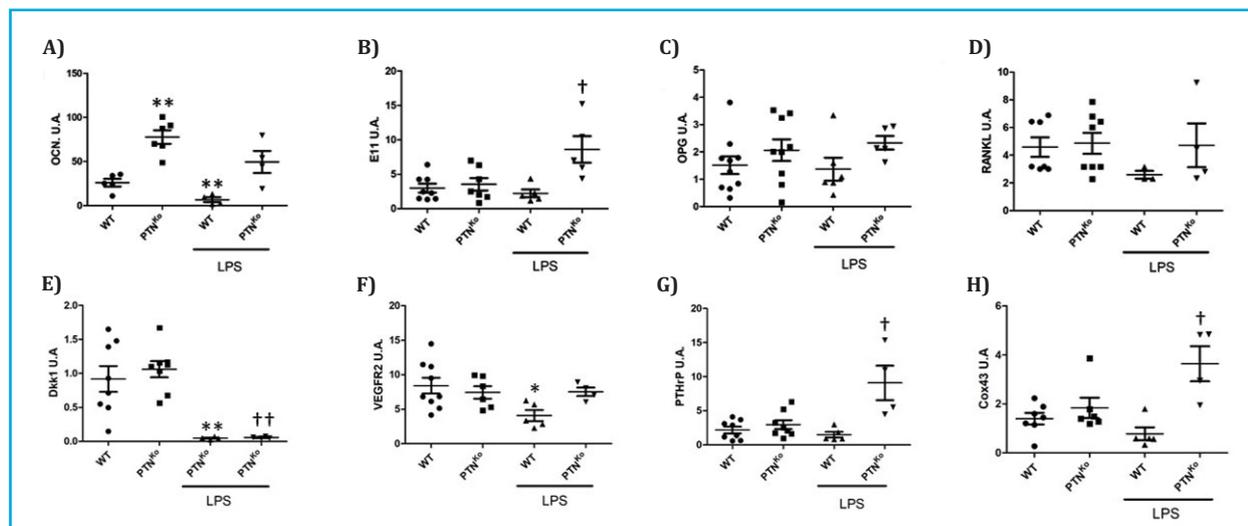
Efecto protector de la PTN ante la inducción de muerte en células óseas

Dado que se ha descrito previamente el efecto proliferador de la PTN en osteoblastos MC3T3²⁴, quisimos comprobar el efecto protector de la PTN frente a la inducción de la muerte por etopósido en dos líneas de células murinas, una de osteoblastos (MC3T3) y otra de osteocitos (MLOY-4), *in vitro*. La administración de la PTN previamente al tratamiento con etopósido produjo un efecto protector, pues la muerte de células inducida por este agente se redujo significativamente en la línea MC3T3 de un 20,8% a un 11,5% y en la línea MLOY4 de un 27,5% a un 18,1% (Figuras 3A, 3B).

DISCUSIÓN

Es notorio el hecho de que la delección de un gen tan importante para el desarrollo y mantenimiento del tejido óseo como la PTN no produzca un fenotipo acusado de alteraciones óseas. En primer lugar, se podría pensar que, ya que la PTN y Mdk tienen expresiones paralelas y funciones similares, la falta de PTN podría ser compensado por el aumento de Mdk. Sin embargo, esto no parece ser así, pues se ha demostrado que los ratones deficientes en Mdk tienen un incremento en la masa ósea²⁹, apuntando a que en el tejido óseo ambas citoquinas no comparten las mismas funciones de manera total. En este trabajo quisimos comprobar cómo era la expresión de genes relacionados con el metabolismo óseo y si esta variación pudiera justificar, al menos en parte, la falta de efectos óseos en los ratones PTN^{Ko}.

Figura 1. Expresión de diferentes genes en las vértebras de ratones WT o PTN^{KO} tratados o no con inyección de LPS



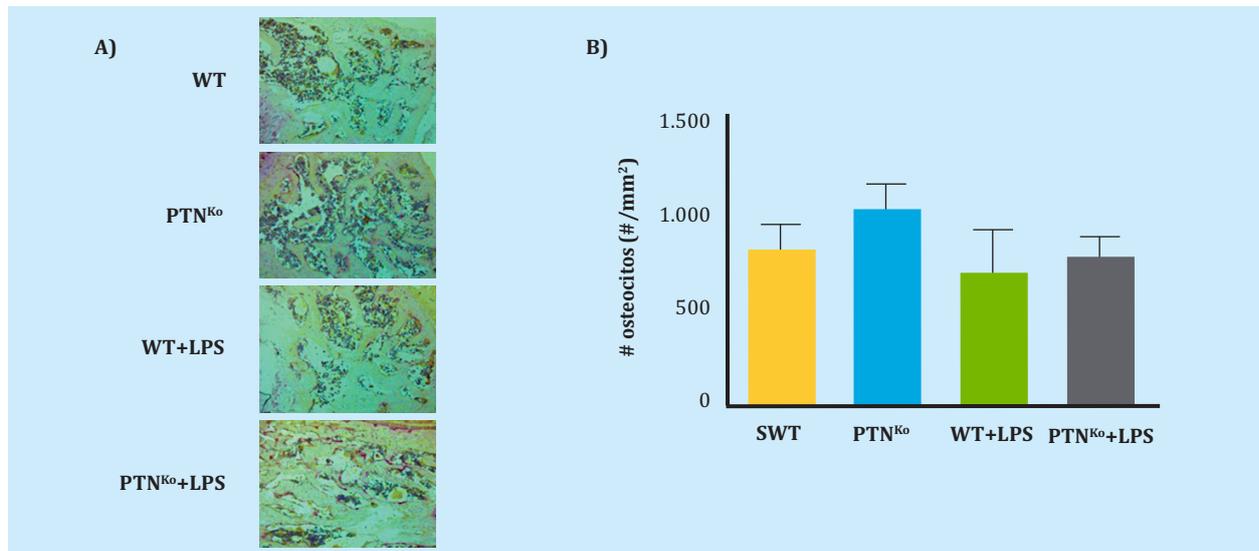
A) Osteocalcina (OCN) vs. WT, ** $p < 0,05$; B) Podoplanina (E11) vs. WT+LPS, † $p < 0,05$; C) Osteoprotegerina (OPG); D) Ligando del receptor activador para el factor nuclear κ B (RANKL); E) Dickkopf1 (Dkk1) vs. WT, ** $p < 0,01$; Dkk1 vs. WT+LPS, †† $p < 0,01$; F) Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular 2 (VEGFR2) vs. WT, * $p < 0,05$; G) Péptido relacionado con la parathormona (PTHrP) vs. WT+LPS, † $p < 0,05$; H) Conexina43 (Cox43), vs. WT+LPS, † $p < 0,05$. Los resultados de la qPCR se expresan con unidades arbitrarias (U.A.) una vez normalizados con el gen de control 18 S ribosomal.

Recientes investigaciones han desvelado que la OCN es una proteína que actúa regulando el correcto alineamiento de los cristales de hidroxapatita con el colágeno, lo cual está directamente relacionado con la calidad ósea³⁵, aunque también es usada como marcador de maduración osteoblástica³⁶, y en estos momentos está bajo debate su papel como hormona producida por el hueso³⁷⁻³⁹. El hecho de que esté aumentada en los ratones PTN^{KO} nos llevó a pensar que quizá el número de osteocitos de manera paralela podría estar incrementado en estos ratones, al ser un marcador de maduración tardía de los osteoblastos justo antes de convertirse en osteocitos, y pudiendo ser este uno de los mecanismos celulares de compensación de la falta de la PTN. Sin embargo, nuestros resultados (Figura 2A, 2B) demuestran que el número de osteocitos no varía significativamente en los ratones PTN^{KO} comparados con los ratones WT ni tampoco en el resto de los grupos experimentales. Estos resultados concuerdan con los mostrados por Lehman y cols., en los cuales se observó un aumento de la expresión de OCN en cultivos primarios procedentes de ratones PTN^{KO} y con un número equivalente de osteocitos entre los ratones normales y los PTN^{KO}²⁷. Cabe pensar que es probable que el aumento de osteocalcina tenga otros efectos en hueso y que la matriz ósea de estos ratones tenga una composición alterada. Para comprobar este extremo serían necesarios estudios posteriores de resonancia magnética nuclear donde se analice la calidad y composición del hueso de los ratones PTN^{KO}.

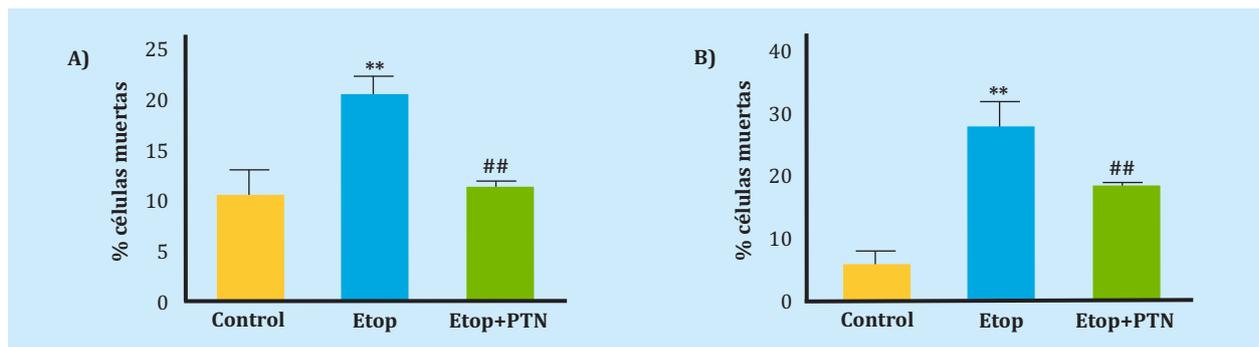
Por otra parte, y dada la importancia que tiene PTN en determinados procesos inflamatorios, quisimos también investigar cuál era su papel en la expresión de estos genes ante una inflamación aguda provocada por inyección de LPS. En este caso descubrimos que la expresión de E11, PTHrP y Cox43 estaba incrementada en los ratones PTN^{KO} frente a los ratones WT tratados con LPS. La PTHrP es una citoquina que modula el remodelado óseo asemejando de manera local las acciones de la parathormona⁴⁰. Esta citoquina está implicada en los procesos inflamatorios que se dan en la médula ósea, pues promueve la expresión del factor inflamatorio MCP-1 en las células endoteliales y osteoblastos⁴¹. E11 gobierna los primeros pasos de la transición

osteoblasto-osteocito⁴², siendo su sobreexpresión un marcador de tumores óseos⁴³ y de inflamación en otros tejidos y diversos tumores⁴⁴. Por otro lado, la Cox43 forma parte de las comunicaciones que establecen los osteocitos entre ellos para formar la red osteocitaria. El papel de las conexinas en los procesos inflamatorios es diverso y variable en función de los distintos tejidos⁴⁵. Se han descrito incrementos de expresión de Cox43 que están relacionados con enfermedades como la artrosis⁴⁶, y una mayor expresión en sinoviocitos ante estímulos como el LPS⁴⁷. Parece ser que la disminución de los niveles de Cox43 estaría relacionado con una disminución de los procesos inflamatorios en los procesos de artritis⁴⁷. En nuestro estudio, la ausencia de PTN, al menos en el compartimento óseo, tendría un papel perjudicial desde un punto de vista inflamatorio, pues permitiría la sobreexpresión de los tres genes citados (Figuras 1B, 1G, 1H) al contrario de lo que ocurre en el ratón WT tratado con LPS, y, por tanto, daría lugar a efectos indeseados. Evidentemente, la verificación última de estas observaciones requiere posteriores estudios tanto *in vivo* como *in vitro* para desentrañar los mecanismos moleculares desencadenados por la ausencia de PTN en este contexto.

Una de las limitaciones de este estudio es que la edad de los ratones era de 3 meses, un poco alejado de los 5 meses en que se puede considerar un ratón maduro desde el punto de vista esquelético. Hay que tener en cuenta que los modelos murinos no sufren cierre de las placas de crecimiento ni depleción estrogénica, lo cual hace que siempre tengan un pequeño crecimiento óseo a lo largo de su vida. A este respecto, hay que señalar que se no se han descrito en ratones deficientes para PTN de 50 semanas graves defectos óseos²⁷, aunque otros autores si han encontrado pequeños retrasos del crecimiento en ratones de 4 meses²⁸. Además, en este último estudio, se ha demostrado que las características biomecánicas de los huesos largos están alteradas al tener disminuidos los parámetros de rigidez, resistencia a la ruptura, y dureza óseas²⁸. Dado que la PTN contribuye a la correcta alineación de los cristales de hidroxapatita, futuros estudios en los huesos de ratones adultos o, incluso, envejecidos con ausencia de PTN, deberían incluir análisis

Figura 2. Número de osteocitos en la sección trabecular de las tibias de los ratones WT y PTN^{Ko}

A) Imágenes representativas de las secciones de tibia donde se realizó el conteo de osteocitos debajo de la placa epifisaria de las tibias de los diferentes grupos experimentales; B) Cuantificación del número de osteocitos por mm² de tejido óseo en los ratones WT, PTN^{Ko}, WT+LPS y PTN^{Ko}+LPS.

Figura 3. Efecto protector de la PTN ante la inducción de muerte con etopósido en células óseas

A) Células MC3T3 vs. control, **p<0,01; Células MC3T3 vs. etopósido, ##p<0,01; B) Células MLOY4 vs. control, **p<0,05; Células MLOY4 vs. etopósido, #p<0,05.

de estos huesos por medio de resonancia magnética nuclear para determinar si la ausencia de PTN puede provocar la creación de un hueso frágil en edades avanzadas. Otra de las limitaciones del estudio, es que, dado que no se han incluido zonas corticales al contar los osteocitos, no podemos establecer si existen diferencias entre los compartimentos cortical y esponjoso, por lo que este tipo de análisis debe de ser realizado en estudios posteriores.

Es de destacar que se ha comprobado previamente, que la administración de la PTN *in vitro* promueve la proliferación y la diferenciación de células osteoblásticas²⁴. Por ello, quisimos comprobar, hasta donde sabemos por primera vez, el efecto protector de la PTN frente a un estímulo pro-apoptótico como es el etopósido en células osteoblásticas (MC3T3) y osteocitos (MLOY4), observando que la PTN tiene una acción protectora. Este resultado apunta a un posible papel adicional de la PTN en situaciones de fractura o inflamación crónica en las cuales podría proteger, al menos parcialmente, a las células óseas. Es cierto que en este estudio no se ha comprobado el papel de protección que pueda desempeñar la PTN en cuanto a la muerte medida por LPS. En este sentido, estudios previos han demostrado que este agente produce un fenotipo senescente en los osteocitos y un aumento

de la resorción ósea mediada por la producción del IL-6 y RANKL por los osteocitos, más que una muerte en un corto periodo de tiempo, como es el tiempo de administración de LPS que se ha realizado en este estudio. Sin embargo, sería interesante estudiar el papel de la PTN en estos contextos en estudios posteriores y en modelos adecuados^{48,49}.

Por todo lo anterior, podemos concluir que la deficiencia de PTN está acompañada de un aumento de la expresión de OCN, y que la inducción de inflamación aguda por medio de LPS en ratones deficientes para PTN produce la sobreexpresión de E11, PTHrP, y Cox43. Así mismo, hemos demostrado el papel protector de la PTN en células osteoblásticas y en osteocitos ante un estímulo de muerte celular.

Financiación: Este trabajo ha sido financiado por los proyectos del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (RTI2018-095615-B-I00), de la Comunidad de Madrid (S2017/BMD-3684) y de la beca FEIOMM de Investigación Traslacional 2015 "Impacto de la diabetes mellitus tipo 2 y el síndrome metabólico en la expresión con en la expresión de miRNAs relacionados con la artrosis".



Conflicto de intereses: Lo autores declaran no tener conflicto de intereses.

Bibliografía

- Vanderwinden JM, Maillieux P, Schiffmann SN, Vanderhaeghen JJ. Cellular distribution of the new growth factor Pleiotrophin (HB-GAM) mRNA in developing and adult rat tissues. *Anat Embryol (Berl)*. 1992;186:387-406.
- Mitsiadis TA, Salmivirta M, Muramatsu T, Muramatsu H, Rauvala H, Lehtonen E, et al. Expression of the heparin-binding cytokines, midkine (MK) and HB-GAM (pleiotrophin) is associated with epithelial-mesenchymal interactions during fetal development and organogenesis. *Development*. 1995;121:37-51.
- Li YS, Milner PG, Chauhan AK, Watson MA, Hoffman RM, Kodner CM, et al. Cloning and expression of a developmentally regulated protein that induces mitogenic and neurite outgrowth activity. *Science*. 1990;250:1690-4.
- Merenmies J, Rauvala H. Molecular cloning of the 18-kDa growth-associated protein of developing brain. *J Biol Chem*. 1990;265:16721-4.
- Tomomura M, Kadomatsu K, Matsuura S, Muramatsu T. A retinoic acid-responsive gene, MK, found in the teratocarcinoma system. Heterogeneity of the transcript and the nature of the translation product. *J Biol Chem*. 1990;265:10765-70.
- Imai S, Kaksonen M, Raulo E, Kinnunen T, Fages C, Meng X, et al. Osteoblast recruitment and bone formation enhanced by cell matrix-associated heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM). *J Cell Biol*. 1998;143:1113-28.
- Rauvala H. An 18-kd heparin-binding protein of developing brain that is distinct from fibroblast growth factors. *EMBO J*. 1989;8:2933-41.
- Tezuka K, Takeshita S, Hakeda Y, Kumegawa M, Kikuno R, Hashimoto-Gotoh T. Isolation of mouse and human cDNA clones encoding a protein expressed specifically in osteoblasts and brain tissues. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;173:246-51.
- Kilpeläinen I, Kaksonen M, Kinnunen T, Avikainen H, Fath M, Linhardt RJ, et al. Heparin-binding growth-associated molecule contains two heparin-binding β -sheet domains that are homologous to the thrombospondin type I repeat. *J Biol Chem*. 2000;275:13564-70.
- Englund C, Birve A, Falileeva L, Grabbe C, Palmer RH. Miple1 and miple2 encode a family of MK/PTN homologues in *Drosophila melanogaster*. *Dev Genes Evol*. 2006;216:10-8.
- Raulo E, Chernousov MA, Carey DJ, Nolo R, Rauvala H. Isolation of a neuronal cell surface receptor of heparin binding growth-associated molecule (HB-GAM). Identification as N-syndecan (syndecan-3). *J Biol Chem*. 1994;269:12999-3004.
- Deepa SS, Yamada S, Zako M, Goldberger O, Sugahara K. Chondroitin sulfate chains on syndecan-1 and syndecan-4 from normal murine mammary gland epithelial cells are structurally and functionally distinct and cooperate with heparan sulfate chains to bind growth factors: A novel function to control binding of midkine, pleiotrophin, and basic fibroblast growth factor. *J Biol Chem*. 2004;279:37368-76.
- Mikelis C, Sfaelou E, Koutsoumpa M, Kieffer N, Papadimitriou E. Integrin α v β 3 is a pleiotrophin receptor required for pleiotrophin-induced endothelial cell migration through receptor protein tyrosine phosphatase β / ζ . *FASEB J*. 2009;23:1459-69.
- Pantazaka E, Papadimitriou E. Chondroitin sulfate-cell membrane effectors as regulators of growth factor-mediated vascular and cancer cell migration. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1840:2643-50.
- Said EA, Courty J, Svab J, Delbé J, Krust B, Hovanessian AG. Pleiotrophin inhibits HIV infection by binding the cell surface-expressed nucleolin. *FEBS J* 2005; 272:4646-4659.
- Deuel TF. Anaplastic lymphoma kinase: 'Ligand Independent Activation' mediated by the PTN/RPTP β / ζ signaling pathway. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1834:2219-23.
- Schinke T, Gebauer M, Schilling AF, Lamprianou S, Priemel M, Mueldner C, et al. The protein tyrosine phosphatase Rptpzeta is expressed in differentiated osteoblasts and affects bone formation in mice. *Bone*. 2008;42:524-34.
- Panicker N, Saminathan H, Jin H, Neal M, Harischandra DS, Gordon R, et al. Fyn kinase regulates microglial neuroinflammatory responses in cell culture and animal models of parkinson's disease. *J Neurosci* 2015;35:10058-10077.
- Xi G, Demambro VE, D'costa S, Xia SK, Cox ZC, Rosen CJ, et al. Estrogen stimulation of pleiotrophin enhances osteoblast differentiation and maintains bone mass in IGFBP-2 null mice. *Endocrinology*. 2020;161(4):bqz007.
- Huang C, Ni Y, Wang T, Gao Y, Haudenschild CC, Zhan X. Down-regulation of the filamentous actin cross-linking activity of cortactin by Src-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*. 1997;272:13911-5.
- Perez-Pinera P, Berenson JR, Deuel TF. Pleiotrophin, a multifunctional angiogenic factor: Mechanisms and pathways in normal and pathological angiogenesis. *Curr Opin Hematol*. 2008;15:210-4.
- Rauvala H. An 18-kd heparin-binding protein of developing brain that is distinct from fibroblast growth factors. *EMBO J* 1989;8:2933-41.
- Fernández-Calle R, Vicente-Rodríguez M, Gramage E, Pita J, Pérez-García C, Ferrer-Alcón M, et al. Pleiotrophin regulates microglia-mediated neuroinflammation. *J Neuroinflammation*. 2017;14(1):46.
- Tare RS, Oreffo ROC, Clarke NMP, Roach HI. Pleiotrophin/osteoblast-stimulating factor 1: Dissecting its diverse functions in bone formation. *J Bone Miner Res*. 2002;17:2009-20.
- Bouderlique T, Henault E, Lebouvier A, Frescaline G, Bierling P, Rouard H, et al. Pleiotrophin commits human bone marrow mesenchymal stromal cells towards hypotrophy during chondrogenesis. *PLoS One*. 2014;9:e88287.
- Yang X, Tare RS, Partridge KA, Roach HI, Clarke NMP, Howdle SM, et al. Induction of human osteoprogenitor chemotaxis, proliferation, differentiation, and bone formation by osteoblast stimulating factor-1/pleiotrophin: osteoconductive biomimetic scaffolds for tissue engineering. *J Bone Miner Res*. 2003;18:47-57.
- Lehmann W, Schinke T, Schilling AF, Catalá-Lehnen P, Gebauer M, Pogoda P, et al. Absence of mouse pleiotrophin does not affect bone formation in vivo. *Bone*. 2004;35:1247-55.
- Imai S, Heino TJ, Hienola A, Kurata K, Büki K, Matsusue Y, et al. Osteocyte-derived HB-GAM (pleiotrophin) is associated with bone formation and mechanical loading. *Bone*. 2009;44:785-94.
- Neunaber C, Catalá-Lehnen P, Beil FT, Marshall RP, Kanbach V, Baranowsky A, et al. Increased trabecular bone formation in mice lacking the growth factor midkine. *J Bone Miner Res*. 2010;25:1724-35.
- Tavella S, Ruggiu A, Giuliani A, Brun F, Canciani B, Manescu A, et al. Bone turnover in wild type and pleiotrophin-transgenic mice housed for three months in the international space station (ISS). *PLoS One*. 2012;7:e33179.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25:402-8.
- Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc*. 2008;3:1101-8.
- Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, et al. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: A 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*. 2013;28:2-17.
- Huang W, Yang S, Shao J, Li YP. Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Front Biosci*. 2007;12:3068-92.
- Nikel O, Laurencin D, McCallum SA, Gundberg CM, Vashishth D. NMR investigation of the role of osteocalcin and osteopontin at the organic-inorganic interface in bone. *Langmuir*. 2013;29:13873-82.
- Weinreb M, Shinar D, Rodan GA. Different pattern of alkaline phosphatase, osteopontin, and osteocalcin expression in developing rat bone visualized by in situ hybridization. *J Bone Miner Res*. 1990;5:831-42.
- Wei J, Karsenty G. An overview of the metabolic functions of osteocalcin. *Rev Endoc Metab Disord*. 2015;16:93-8.
- Diegel CR, Hann S, Ayturk UM, Hu JCW, Lim KE, Droscha CJ, et al. An osteocalcin-deficient mouse strain without en-

- doocrine abnormalities. *PLoS Genet.* 2020;16 (5):e1008361.
39. Moriishi T, Ozasa R, Ishimoto T, Nakano T, Hasegawa T, Miyazaki T, et al. Osteocalcin is necessary for the alignment of apatite crystallites, but not glucose metabolism, testosterone synthesis, or muscle mass. *PLoS Genet* 2020;16 (5):e1008586.
40. Uy HL, Guise TA, Mata JD La, Taylor SD, Story BM, Dallas MR, et al. Effects of parathyroid hormone (pth)-related protein and pth on osteoclasts and osteoclast precursors in vivo. *Endocrinology.* 1995;136:3207-12.
41. Lu Y, Xiao G, Galson DL, Nishio Y, Mizokami A, Keller ET, et al. PTHrP-induced MCP-1 production by human bone marrow endothelial cells and osteoblasts promotes osteoclast differentiation and prostate cancer cell proliferation and invasion in vitro. *Int J Cancer.* 2007; 121:724-33.
42. Zhang K, Barragan-Adjemian C, Ye L, Kotha S, Dallas M, Lu Y, et al. E11/gp38 Selective Expression in Osteocytes: Regulation by Mechanical Strain and Role in Dendrite Elongation. *Mol Cell Biol.* 2006;26:4539-52.
43. Ariizumi T, Ogose A, Kawashima H, Hotta T, Li G, Xu Y, et al. Expression of podoplanin in human bone and bone tumors: New marker of osteogenic and chondrogenic bone tumors. *Pathol Int.* 2010;60:193-202.
44. Quintanilla M, Montero LM, Renart J, Villar EM. Podoplanin in inflammation and cancer. *Int J Mol Sci.* 2019;20 (3):707.
45. Willebrords J, Crespo Yanguas S, Maes M, Decroock E, Wang N, Leybaert L, et al. Connexins and their channels in inflammation. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2016;51:413-39.
46. Casagrande D, Stains JP, Murthi AM. Identification of shoulder osteoarthritis biomarkers: Comparison between shoulders with and without osteoarthritis. *J Shoulder Elb Surg.* 2015; 24:382-90.
47. Tsuchida S, Arai Y, Kishida T, Takahashi KA, Honjo K, Terauchi R, et al. Silencing the expression of connexin 43 decreases inflammation and joint destruction in experimental arthritis. *J Orthop Res.* 2013;31:525-30.
48. Yu K, Ma Y, Li X, Wu X, Liu W, Li X, et al. Lipopolysaccharide increases IL-6 secretion via activation of the ERK1/2 signaling pathway to up-regulate RANKL gene expression in MLO-Y4 cells. *Cell Biol Int.* 2017;41:84-92.
49. Aquino-Martinez R, Rowsey JL, Fraser DG, Eckhardt BA, Khosla S, Farr JN, et al. LPS-induced premature osteocyte senescence: Implications in inflammatory alveolar bone loss and periodontal disease pathogenesis. *Bone.* 2020; 132:115220.