

**Giner M<sup>1</sup>, Montoya MJ<sup>2</sup>, Vázquez MA<sup>2</sup>, Miranda M<sup>1</sup>, Pérez-Cano R<sup>1,2</sup>**

1 Unidad de Osteoporosis - Servicio Medicina Interna - Hospital Universitario Virgen Macarena - Sevilla

2 Departamento de Medicina - Facultad de Medicina - Universidad de Sevilla

## Estudio preliminar sobre osteoblastos en sangre periférica en la población infantil y adolescente\*

Correspondencia: Mercedes Giner - Unidad de Osteoporosis - Servicio de Medicina Interna - Hospital Universitario Virgen Macarena - Avda. Dr. Fedriani, s/n - 41009 Sevilla  
Correo electrónico: merce\_giner@yahoo.es

Fecha de recepción: 22/02/2010

Fecha de aceptación: 07/10/2010

\* Póster becado por la SEIOMM para el congreso ASBMR, Denver 2009

### Resumen

La presencia de la osteoporosis en la vida adulta está condicionada al desarrollo y formación adecuada del hueso durante el crecimiento en la infancia y adolescencia y a la pérdida sucesiva que ocurre a lo largo de la vida. Los conocimientos sobre las células del tejido óseo y sus precursores en las etapas de crecimiento son escasos dado la dificultad para la obtención de muestras de este tejido. Recientes estudios señalan un método para obtener células de estirpe osteoblástica a partir de sangre periférica.

El objetivo principal de este trabajo ha sido cuantificar las células de estirpe osteoblástica en sangre periférica en niños y adolescentes, así como conocer posibles diferencias según las etapas de crecimiento. Se estudian 38 sujetos, 16 niños (edad entre 4-12 años) y 12 adolescentes (edad entre 12-18 años). Se analizan células precursoras de osteoblastos en sangre periférica, mediante técnica de citometría de flujo. Los resultados preliminares demuestran mayores niveles de células preosteoblásticas en el grupo de edad más joven:  $4,17\% \pm 0,92$  vs.  $2,03\% \pm 0,48$ ,  $p= 0,021$ . Existe una correlación negativa entre el porcentaje de células preosteoblásticas y la edad  $r= -0,488$  y el peso  $r= -0,530$ ,  $p< 0,05$ . En resumen, esta técnica nos permite cuantificar preosteoblastos en sangre periférica y demostramos la existencia de un porcentaje mayor de las mismas cuanto menor sea la edad, durante el periodo de la infancia y adolescencia.

**Palabras clave:** Osteoblastos, Sangre periférica, Niños, Adolescentes.

## Preliminary study of osteoblasts in peripheral blood in the population of infants and adolescents

### Summary

The presence of osteoporosis in adult life is conditional on the adequate development and formation of bone during growth in infancy and adolescence and the successive loss which occurs throughout life. Knowledge regarding bone tissue cells and their precursors in stages of growth is scarce, given the difficulties in obtaining samples of this tissue. Recent studies suggest a method of obtaining osteoblast line cells from peripheral blood. The main objective of this work has been to quantify the osteoblast line cells in the peripheral blood of infants and adolescents, as well as noting any possible differences according to the stage of growth.

38 subjects were studied, 16 children (between 4 and 12 years of age) and 12 adolescents (aged between 12 and 18 years). Osteoblast precursor cells in peripheral blood were analysed using the flow cytometry technique. The preliminary results show higher levels of preosteoblastic cells in the youngest age group:  $4.17\% \pm 0.92$  vs.  $2.03\% \pm 0.48$ ,  $p=0.021$ . There is a negative correlation between the percentage of preosteoblastic cells and age  $r=-0.488$  and weight  $r=-0.530$ ,  $p<0.05$ . In summary, this technique allows us to quantify preosteoblasts in peripheral blood, and we show that they have a higher percentage, the lower the age, during the period of infancy and adolescence.

**Key words:** *Osteoblasts, Peripheral blood, Infants, Adolescents.*

### Introducción

La osteoporosis es una enfermedad de la vida adulta caracterizada por la presencia de fracturas no traumáticas y entre los factores determinantes de esta menor resistencia del hueso, uno de los más importantes es la menor densidad mineral ósea del esqueleto. La masa ósea evoluciona a lo largo de la vida. Durante la época de crecimiento el hueso se forma hasta alcanzar el pico en la edad adulta joven, posteriormente a partir de los 35-40 años es fisiológico que se produzca un descenso de masa ósea. Por tanto, se puede llegar a una disminución de la densidad mineral ósea importante por dos motivos fundamentales, por una menor formación de hueso durante la época de crecimiento o por que exista una pérdida excesiva a partir de la edad adulta<sup>1</sup>.

Hasta el momento actual la mayoría de los estudios de investigación se centran en la etapa adulta de pérdida ósea, muy poco es conocido sobre el desarrollo y formación del esqueleto a nivel íntimo, durante la etapa de crecimiento de la infancia y la adolescencia, dado que para ello sería necesario realizar biopsias óseas y ello supone llevar a cabo una técnica cruenta y poco admitida en esta fase de la vida. Sin embargo, el conocimiento fisiológico del metabolismo óseo a lo largo del crecimiento es de gran importancia dado que de ello depende el capital de hueso que un individuo llega a adquirir.

Actualmente conocemos que los precursores de células osteoblásticas y osteoclasticas, además de residir en la médula ósea, son capaces de movilizarse a través de sangre periférica para dirigirse a las zonas que presenten un remodelado óseo activo<sup>2</sup>. El problema es que con las técnicas que se venían utilizando, el número de precursores osteoblásticos circulantes en sangre, descritos hasta el momento, siempre ha sido muy bajo y difícil de

detectar<sup>3,4</sup>. Koshla y cols.<sup>2</sup> se plantearon la posibilidad de utilizar la técnica de citometría de flujo, con anticuerpos contra proteínas específicas del hueso (osteocalcina y fosfatasa alcalina) para identificar mejor las células pre-osteoblásticas circulantes en sangre periféricas, y además, si estas células osteoblásticas tienen un papel fisiológico en la formación de hueso, es de esperar que su concentración aumente en las condiciones de formación de hueso<sup>5,6</sup>.

Nuestro objetivo principal ha sido cuantificar las células de estirpe osteoblástica en sangre periférica en niños y adolescentes sanos, así como conocer posibles diferencias, según las etapas de crecimiento y el género.

### Material y método

#### Grupo de estudio

Hemos estudiado a 38 sujetos (cuyos padres/tutores previamente habían dado consentimiento, una vez informados del estudio) divididos en dos grupos según la edad: Grupo A (4-12 años), 16 niños (7 mujeres, 9 hombres); grupo B (13-18 años), 12 adolescentes (2 mujeres, 10 hombres). El periodo de estudio ha sido a lo largo del año 2008 y los sujetos procedían de la consulta del seguimiento del niño sano o del Servicio de Oftalmología del Hospital Universitario Virgen Macarena. A todos ellos, tras realizar un interrogatorio sobre estado de salud actual y anterior, se les realizó: determinación de talla, peso e índice de masa corporal (IMC), así como, se les tomó una muestra sanguínea a nivel periférico para las determinaciones de calcio y fosfatasa alcalina ósea (FAO) y para determinar las células preosteoblásticas circulantes en sangre.

Ninguno de los sujetos seleccionados presentaba enfermedades relacionadas con el metabolismo óseo ni estaban tomando medicación.

### Extracción de células mononucleares

Para la obtención de células mononucleares diluimos la sangre total con PBS (1:1). La sangre diluida se añade sobre una solución de Ficoll-Hypaque 1:2 y se centrifuga (1250 xg, 20 min 4° C). El anillo formado en la interfase contiene las células mononucleares, se recogen y se lavan con PBS. Posteriormente realizamos un choque hipoosmótico con H<sub>2</sub>O destilada y desionizada para lisar los glóbulos rojos contaminantes y le añadimos NaCl al 1,8% para reestablecer la isoomolaridad, lavamos con PBS y contamos las células con un hematocitómetro, determinamos su viabilidad por exclusión al Tripán Blue.

### Citometría de flujo

Para el análisis citométrico incubamos las células con el anticuerpo anti-osteocalcina-ficoeritrina y seleccionamos el canal de lectura correspondiente a la luz emitida. La población positiva será identificada como células que expresen niveles específicos de la actividad fluorescente frente a la autofluorescencia no específica de los isotipos controles. Las células identificadas serán expresadas como porcentaje del "gate" seleccionado inicialmente correspondiente al área de los linfocitos- monocitos.

### Recogida y análisis de datos

Todos los experimentos han sido reproducidos tres veces, aceptando el valor de la media aritmética de las determinaciones repetidas. Los valores cuantitativos se expresan como media  $\pm$  DS.

Para el manejo estadístico de resultados se ha utilizado el paquete SPSS versión 17.0. Utilizando el test de ANOVA para comparar las variables cuantitativas y el cociente de correlación de Pearson de correlaciones entre variables.

En todos los casos se consideró como nivel de significación el 5% ( $p < 0,05$ ).

### Resultados

Queremos señalar que presentamos resultados preliminares dado que en la actualidad continuamos aumentando el tamaño muestral de todos los grupos.

La edad media del grupo de niños ha sido de  $9,05 \pm 3$  años, de ellos 7 han sido niñas y 9 niños, de edades comparables. En el grupo de adolescentes, la edad media ha sido  $14,16 \pm 1,2$  años, 2 niñas y 10 niños. Las características de ambos grupos se expresan en la Tabla 1. No observamos diferencias significativas en los valores de IMC, calcio y fosfatasa alcalina entre los dos grupos estudiados, ni dentro de un mismo grupo entre género.

Las células de estirpe osteoblástica han sido cuantificadas según el porcentaje de células positivas a osteocalcina circulantes en sangre periférica, por citometría de flujo.

El grupo de niños entre 4-12 años presenta un porcentaje de células preosteoblásticas (pre-OB) en sangre periférica significativamente superior

Tabla 1. Características antropométricas y parámetros bioquímicos séricos relacionados con el metabolismo cálcico de los grupos estudiados. Los resultados son expresados en media  $\pm$  desviación estándar

Variables	Grupo A (4-12 años) n = 16	Grupo B (13-16 años) n = 12
Edad (años)	9,05 $\pm$ 3	14,16 $\pm$ 1,2
Talla (cm)	136,5 $\pm$ 20,5	158,5 $\pm$ 9,1
Peso (Kg)	39,26 $\pm$ 18	53,5 $\pm$ 10,7
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	19,69 $\pm$ 4,5	21,1 $\pm$ 2,55
FAO (U/L)	550 $\pm$ 181	576 $\pm$ 79,7
Calcio (mg/dl)	9,7 $\pm$ 0,38	9,8 $\pm$ 0,37

IMC: índice de masa corporal

FAO: fosfatasa alcalina ósea

(4,17%  $\pm$  0,92) al obtenido en adolescentes mayores de 12 años (2,03%  $\pm$  0,48  $p = 0,021$ ) (Figura 1).

Al analizar los datos por sexo no encontramos diferencias dentro de un mismo grupo. Concretamente, en el grupo A los niveles de pre-OB fueron ligeramente superiores en el sexo masculino (4,5%  $\pm$  0,9) que en el femenino (3,34%  $\pm$  0,9), si bien esta diferencia no alcanzó significación estadística. Y para el grupo B la cuantía de células pre-OB también fue muy semejante (1,95%  $\pm$  1,96 niños; 1,06%  $\pm$  1,03 niñas) (Figura 2).

Hemos comprobado que existe una correlación negativa entre el porcentaje de células preosteoblásticas osteocalcina positivas circulantes en sangre periférica y la edad ( $r = -0,488$  y  $p = 0,005$ ). Y así como entre el número y el peso ( $r = -0,530$   $p = 0,035$ ).

### Discusión

En este trabajo demostramos que, mediante técnicas de citometría de flujo, es posible cuantificar células de estirpe osteoblástica en población joven. En adultos se había señalado que la cantidad de estas células era prácticamente indetectable, mientras que se vieron incrementadas en pacientes con fractura ósea<sup>3,4</sup>. Consideramos que el poder disponer de esta técnica nos permite valorar en niños y adolescentes aspectos muy importantes relacionados con el metabolismo óseo que de otra forma sería difícil llevar a cabo, por la necesidad de analizar muestras obtenidas por biopsias óseas.

Hemos observado que el número de pre-osteoblastos en sangre periférica es dependiente de la edad, alcanzando valores superiores en niños más jóvenes,  $\leq 12$  años, respecto a niños adolescentes entre 12-16 años. Estos resultados nos podrían indicar que las células pre-osteoblásticas en sangre periférica

Figura 1. Valor medio de células osteocalcina positivas para el grupo A (4-12 años) y para el grupo B (13-18 años)

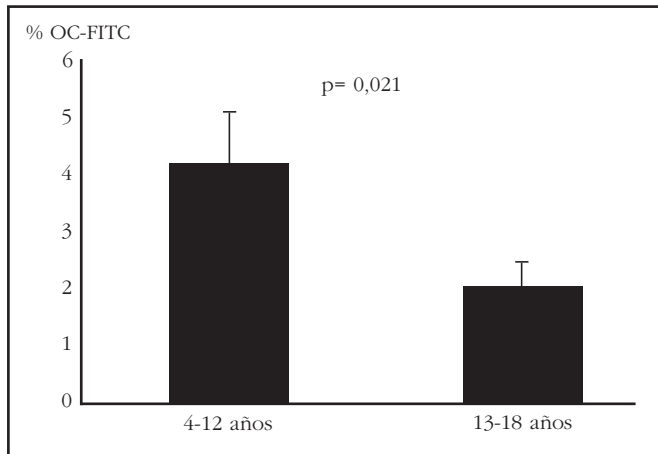
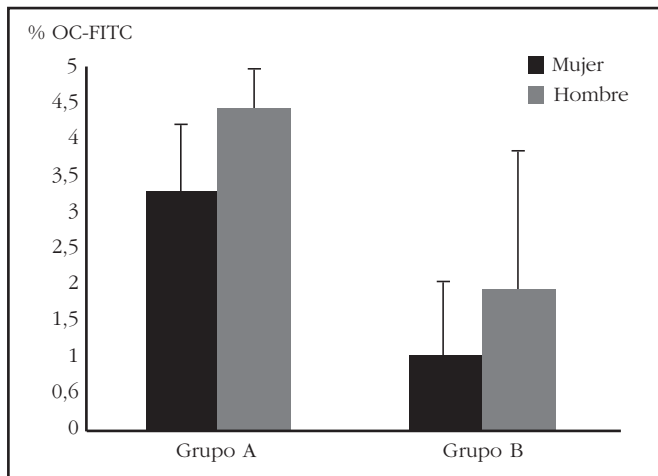


Figura 2. Valor medio de los grupos A (4-12 años) y B (13-18 años) separados por sexo



aumentan tanto más cuanto más activo sea el remodelado óseo. Los niños en fase de crecimiento más rápido les corresponde un modelado óseo, también, más activo y, por tanto, mayor la cantidad de células de estirpe osteoblástica circulante. Por este mismo mecanismo, los pacientes con fractura ósea, en los que existe una mayor formación de hueso en la zona esquelética donde se genera el cayo de fractura, también se describe mayor porcentaje de pre-osteoblastos circulantes a nivel periférico, cuando se comparan con los valores obtenidos en sujetos sanos<sup>5</sup>.

El número de células pre-osteoblásticas en sangre periférica, no solo correlaciona con la edad, sino que también hemos observado una correlación negativa con el peso ( $r = -0,530$   $p = 0,035$ ). Estos resultados pueden estar en consonancia de que ambas tanto los osteoblastos como los adipocitos derivan de la misma célula madre pluripotente y, por tanto, la mayor diferenciación en un sentido puede acompañarse de una menor proporción del resto de las células.

En momentos del desarrollo del individuo en que la actividad de formación ósea es superior a la formación de tejido adiposo, como suele ser habitual en

edades de crecimiento infantil, deben estar activados predominantemente las señales celulares hacia la formación y maduración osteoblástica (aumento de vía Wnt canónica con sobreexpresión de Runx2...) a expensas de la génesis de adipocitos (disminución de PPAR $\gamma$ 2). Estos datos necesitan ser comprobados, pero estarían en relación con la mayor formación de adipocitos a nivel de la médula ósea a expensas de la menor cuantía de osteoblastos que se ha comprobado en la población adulta<sup>7</sup>.

No hemos encontrado diferencias en la cuantía de pre-osteoblastos en sangre periférica por el género. En la etapa infantil se sabe que niños y niñas incrementan la masa ósea a medida que crecen en altura de una forma semejante. A partir de la adolescencia e influido por las hormonas sexuales, es cuando se observa que ambas curvas de incremento de DMO se separan, adquiriendo valores más elevados en el sexo masculino<sup>8</sup>. En nuestro estudio son escasos el número de sujetos valorados en este periodo y sobre todo en el sexo femenino. Se requiere estudiar una población mayor de mujeres adolescentes para llegar a conclusiones definitivas en este sentido.

En definitiva podemos concluir, a pesar del pequeño tamaño muestral, que mediante técnica de citometría de flujo y el empleo de marcadores celulares de osteoblastos, como la osteocalcina, es posible cuantificar un porcentaje valorable de células de estirpe osteoblástica en sangre periférica en niños y adolescentes sanos. Además, demostramos un porcentaje mayor de estas células en niños más pequeños, en los que la formación ósea es más intensa, y en relación inversa con el peso corporal.

## Bibliografía

1. Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodelling. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1092:385-96.
2. Khosla S, Eghbali-Fatourehchi GZ. Circulating Cells with osteogenic potential. *Ann NY Acad Sci* 2006;1068:489-97.
3. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, Maini RN. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2000;2:477-88.
4. Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol* 2001;153:1133-40.
5. Eghbali-Fatourehchi GZ, Lamsam J, Fraser D, Nagel D, Riggs BL, Khosla S. Circulating osteoblast-lineage cells in humans. *N Engl J Med* 2005;352:1959-66.
6. Eghbali-Fatourehchi GZ, Mödder U and Khosla S. Characterization of circulating osteoblast lineage cells in humans. *Bone* 2007;40:1370-7.
7. Takada I, Kouzmenko AP, Kato S. Molecular switching of osteoblastogenesis versus adipogenesis: implications for targeted therapies. *Expert Opin Ther Targets* 2009;13:593-603.
8. Monson JP, Drake WM, Carroll PV, Weaver JU, Rodriguez-Arnao J, Savage MO. Influence of growth hormone on accretion of bone mass. *Horm Res* 2002;58:52-6.