

# Acción del aluminio sobre células óseas: efecto modulador de las citoquinas

S. J. McGregor, M. J. Fernández Menéndez, P. Menéndez Fraga, J. H. Brock \* y J. B. Cannata

Unidad de Investigación. Metabolismo Oseo y Mineral. Hospital Central de Asturias. Oviedo.

\* Departamento de Inmunología. Western Infirmary, Glasgow.

## Introducción

El aluminio (Al) se encuentra depositado en altas concentraciones en el hueso en al menos tres de las cinco lesiones clásicas de la osteodistrofia renal. Independientemente de la vía de entrada en el cuerpo, la mayor proporción de Al se deposita en el tejido óseo. Esta mayor predisposición a localizarse en el hueso podría estar mediada por citoquinas tales como las interleuquinas 1 y 6 (IL1 e IL6) y el factor de necrosis tumoral (TNF), sustancias cuyos niveles pueden aumentar durante la diálisis<sup>1,2</sup>, y que podrían favorecer la captación de Al a través de los receptores de transferrina (Tf), al igual que lo hacen con el hierro<sup>3</sup>.

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de IL1, TNF e IL6 sobre la incorporación de timidina, los niveles de DNA y la captación celular de Al en osteoblastos humanos (células MG. 63).

## Material y métodos

Cultivos semiconfluentes de la línea humana «osteoblasto-like» MG-63 fueron incubados durante 24 ó 48 horas en frascos de 25 cm<sup>2</sup>, en 5 ml MEM-Earle (Cultek, Madrid), suplementado con suero fetal bovino (0,2 %), albúmina humana (0,2 %, Sigma, Madrid) y con 100 µg/ml de ATF. Se añadieron distintas concentraciones de IL-1, TNF o IL-6 a los cultivos. Después de la incubación, las células se lavaron con suero fisiológico (PBS) y se lisaron con 0,05 % dodecil sulfato sódico (SDS). Se midió la captación de Al por espectrometría de absorción atómica y el contenido de DNA por fluorimetría, para expresar la captación del Al en ng Al/µg DNA.

La proliferación celular se midió mediante la incorporación de timidina tritiada. Cuatro horas antes del final de

la incubación, se añadió a la suspensión celular 5 µCi de <sup>3</sup>H-timidina (Amersham International, actividad específica de 5 Ci/mmol), y a continuación las células se lavaron y lisaron con SDS y la radiactividad se determinó en un contador beta.

## Resultados

### Captación de aluminio

Tanto la IL-1 como el TNF aumentaron la captación de Al por las células MG-63 (fig. 1). Las concentraciones óptimas fueron de 50 unidades/ml para ambas citoquinas. Sin embargo, los resultados con IL-6 añadida a concentraciones entre 0,001 y 10 unidades/ml fueron muy variables, por lo que no se realizaron más estudios con esta citoquina. Cuando las células fueron incubadas durante 24 horas en lugar de 48 horas, la captación de Al disminuyó un 34 y 26 % en las células incubadas con TNF e IL-1, respectivamente. Sin embargo, en los controles la captación de Al fue casi idéntica tanto a 24 como a 48 horas. La captación de Al por las células incubadas con IL-1 y TNF durante 24 horas fue mayor que en los controles, al igual que en las células incubadas durante 48 horas.

### Proliferación celular

El TNF impidió el crecimiento de las células y no se observó ningún aumento en la captación de timidina entre las 24 y 48 horas de incubación (fig. 2). El efecto inhibitorio de la IL-1 fue menor, y hubo más incorporación de timidina a las 48 horas que a las 24, lo que significa que las células crecieron, aunque de forma más lenta que los controles.

### Contenido de DNA

A las 24 horas no hubo diferencia entre los distintos grupos en el contenido de DNA. Por otra parte, a las

Correspondencia: Jorge B. Cannata Andía.  
Unidad de Investigación.  
Hospital Central de Asturias.  
Apdo. Correos 243.  
33080 Oviedo.

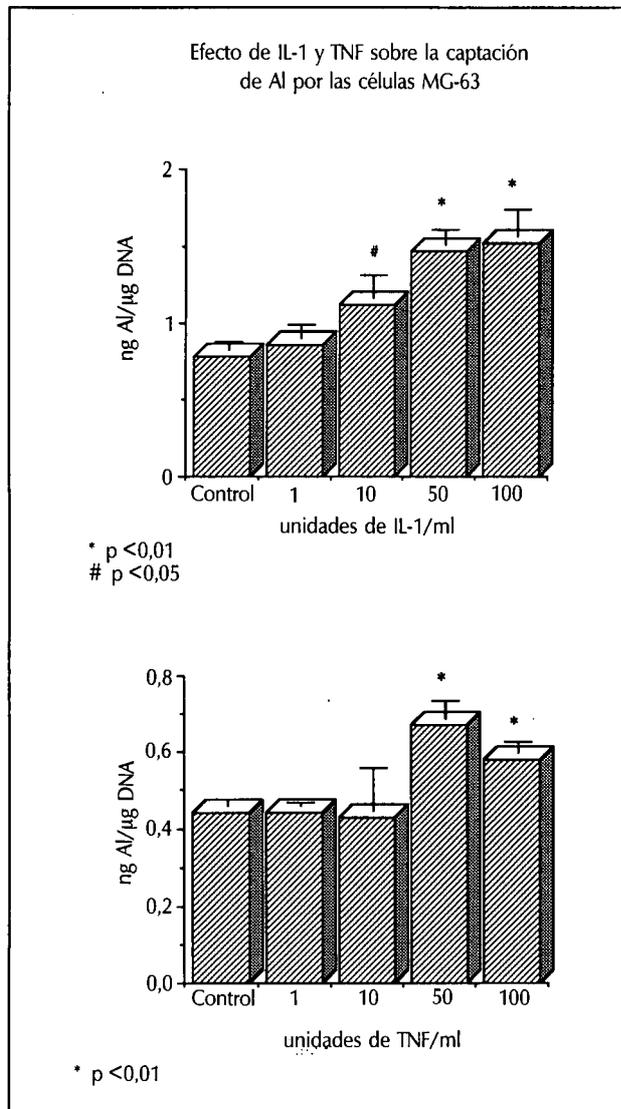


Fig. 1.—Las células fueron incubadas durante 48 horas en presencia de distintas concentraciones de IL-1 (a) y TNF (b). Los resultados corresponden a un experimento representativo, que se repitió 3 veces, y son la media  $\pm$  SD de cultivos por triplicado.

48 horas el contenido de DNA en las células incubadas con TNF fue 37 % menor que a las 24 horas, mientras en las células incubadas con IL-1 y en los controles, la cantidad de DNA aumentó un 32 y 39 % a las 24 y 48 horas, respectivamente.

### Discusión

En este trabajo se ha demostrado que tanto la IL-1 como el TNF aumentaron la captación de Al por los osteoblastos MG-63, alcanzando valores más significativos a

partir de 50 unidades/ml ( $p < 0,05$ ), especialmente a las 48 horas de incubación. Además, el TNF inhibió la incorporación de timidina, que es una medida de la proliferación celular, y produjo necrosis celular, siendo su efecto mayor a las 48 horas que a las 24. Tatakis y Dziak<sup>4</sup> también han encontrado un efecto inhibitor del TNF sobre la proliferación de osteoblastos.

La IL-1 también produjo una disminución en la proliferación celular, pero ésta fue menos acentuada que con el TNF y además no hubo necrosis celular, dado que la cantidad de DNA siguió aumentando entre las 24 y 48 horas. Linkhart y cols.<sup>5</sup> han observado que la IL-1 inhibe la proliferación de osteoblastos y estimula la resorción ósea.

La disminución del contenido de DNA y de la proliferación celular observada en este estudio podría ser debida no solamente a las citoquinas en sí, sino también al aumento en la captación de Al, ya que Kasai y cols.<sup>6</sup> han demostrado que el Al inhibe la síntesis de DNA en osteoblastos *in vitro*. Se ha encontrado también que el Al estimula la producción de IL-1 por monocitos<sup>7</sup>. Así, se puede considerar el efecto de las citoquinas IL-1 y TNF y del Al como un mecanismo sinérgico en la inhibición de la función de los osteoblastos. Este mecanismo puede convertirse en una condición crónica en los pacientes de diálisis, en los que los niveles de IL-1 y TNF aumentan permanentemente con respecto a los controles<sup>1</sup>.

Por último, no se observó ningún efecto reproducible de la IL-6 sobre la captación de Al por las células MG-63. Tampoco hubo efecto sobre la proliferación celular (datos no presentados), lo cual está de acuerdo con los hallazgos de Linkhart y cols.<sup>5</sup>. Es posible que la falta de efecto de la IL-6 sobre la captación de Al se relacione con la ausencia de un efecto sobre la proliferación celular.

En resumen, estos resultados sugieren que la liberación

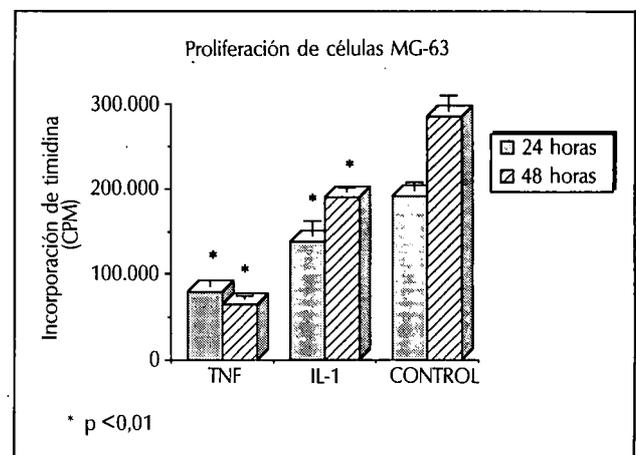


Fig. 2.—Las células fueron incubadas durante 24 ó 48 horas en presencia de 50 unidades de TNF o IL-1 o sin citoquinas (control). Los resultados son de un experimento representativo, repetido 6 veces, y son la media  $\pm$  SD de cultivos por cuadruplicado.

de citoquinas producida durante la diálisis podría aumentar el efecto tóxico del Al sobre el metabolismo óseo, aumentando la concentración celular de Al y a la vez disminuyendo el crecimiento de los osteoblastos.

Este proyecto ha sido parcialmente financiado por una beca del Ministerio de Educación y Ciencia (1992).

### Bibliografía

1. Herbelin A, Nguyen AT, Zingraff J, Urena P, Descampsatscha B: «Influence of uremia and hemodialysis on circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha». *Kidney International* 37:116-125, 1990.
2. Herbelin A, Urena P, Nguyen AT, Zingraff J, Descampsatscha B: «Elevated circulating levels of inteleukin-6 in patients with chronic-renal failure». *Kidney International* 39:954-960, 1991.
3. Tsuji Y, Miller LL, Miller SC, Torti SV, Torti FM: «Tumor-necrosis-factor-alpha and inteleukin-1-alpha regulate transferrin receptor in human-diploid fibroblast; relationship to the inducing of ferritin heavy-chain». *Journal of Biological Chemistry* 266:7257-7261, 1991.
4. Tatakis DN, Dziak R: «Recombinant human lymphotoxin effects on osteoblastic cells». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 162:435-440, 1989.
5. Linkhart TA, Linkhart SG, Maccharles DC, Long DL, Strong DD: «Interleukin-6 messenger-RNA expression and inteleukin-6 protein secretion in cells isolated from normal human bone; regulation by inteleuking-1». *Journal of Bone and Mineral Research* 6:1285-1294, 1991.
6. Kasai K, Hori MT, Goodman WG: «Transferrin enhances the anti-proliferative actions of aluminum in osteoblasts-like cells». *Kidney International* 37:449,1990.
7. Mannhalter JW, Neychev GJ, Zlabinger R, Eibl A, Eibl M: «Modulation of the human immune response by the non-toxic and non-pyrogenic adjuvant aluminium hydroxide: effect on antigen uptake and antigen presentation». *Clinical Experimental Immunology* 61:143-151, 1985.