

Expresión del ligando del receptor activador Nf-κB (Rankl) en los fibroblastos de la membrana sinovial de pacientes con artritis reumatoide

Antonio Tristano; Martín A. Rodríguez;
Fabiola Pláceres
Archivos del Centro Nacional de Enfermedades
Reumáticas (CNER). Febrero de 2003.

Introducción

La Artritis Reumatoidea (AR) es una enfermedad crónica, que destruye cartílago y hueso de las articulaciones.(1) Asimismo, es la artritis inflamatoria más común y afecta aproximadamente al 1% de la población general. Histopatológicamente, se caracteriza por hiperplasia de la íntima sinovial; presencia de una densa microvasculatura; infiltración de células mononucleares, principalmente células T y macrófagos; y formación de folículos linfoides (1,2).

En la AR, además de los macrófagos y las células T, los fibroblastos sinoviales activados juegan un papel importante, tanto en la iniciación como en el progreso de la enfermedad.(3) Observaciones en este tipo de artritis, establecieron que los sinoviocitos tipo fibroblastos de la íntima sinovial diferían, tanto de los fibroblastos de la sinovial normal, como de aquellos encontrados en las capas más profundas de la sinovial reumatoide. Esto, por mostrar evidencias de activación incrementada, que resulta en un comportamiento agresivo e invasivo en el pannus (4).

Las características más prominentes de los fibroblastos reumatoideos activados, son su crecimiento independiente de anclaje, es decir, su capacidad de crecer in vitro en medios semisólidos como el agar; su habilidad para unirse a la matriz extracelular; y su capacidad de invadir profundamente al cartílago articular. Evidencias crecientes sugieren que la activación de los

fibroblastos reumatoideos, a veces llamada transformación parcial, constituye una alteración intrínseca estable, que es mantenida aún en ausencia de citocinas proinflamatorias (5).

El co-cultivo de fibroblastos con células mononucleares de sangre periférica, genera la diferenciación de estas últimas a células semejantes a osteoclastos con capacidad reabsortiva, efecto que es inhibido por la Osteoprotegerina (OPG).(6,8) Esta molécula es estructuralmente diferente a Receptor Activador of NF-κB Ligand (RANKL), no contiene el dominio transmembrana. Además, representa una forma secretada del receptor del TNF, y se une al RANKL, impidiendo su efecto inductor en la diferenciación de osteoclastos (9,10).

El OPG contiene cuatro dominios ricos en cisteína y dos regiones homólogas a los dominios de muerte, que en inglés se denominan Death Domain Homologous (DDH). La región DDH muestra características similares a los dominios de muerte de los receptores p55, Fas, DR3 y TRAIL, los cuales median la señal apoptótica. Los dominios ricos en cisteína del OPG, pero no los DDH, son esenciales para inducir actividad biológica in vitro.(11) El OPG puede existir como monómero o dímero como resultado de la formación de puentes disulfuro a nivel del residuo Cys400. La substitución de Cys400 por Ser, no afecta la actividad inhibitoria de OPG, sugiriendo que la dimerización no es necesaria para su actividad biológica (11)

RANKL, Artritis Reumática y Osteoarthritis

Por lo menos un componente de la reabsorción ósea focal, observada en la Artritis Reumatoidea (AR), es mediada por células que expresan un fenotipo de osteoclastos auténticos, probablemente originadas a partir de células sinoviales semejantes a los macrófagos. La

regulación de la diferenciación y de la actividad de estas células, es mediada principalmente por la molécula Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL), la cual fue identificada como el ligando del receptor activador de NF- κ B. El RANKL se expresa en los fibroblastos reumatoideos, osteoblastos y linfocitos T activados y se une a su receptor RANK (Receptor Activator of NF- κ B), expresado en las células precursoras de osteoclastos. El RANKL humano es un polipéptido de 317 aminoácidos, idéntico en un 87% al RANKL murino, lo que indica que esta proteína se conserva durante la evolución. La secuencia de aminoácidos contiene probablemente dominios hidrofóbicos entre los residuos 49 y 69, un dominio intracelular N-terminal corto y un dominio extracelular C-terminal largo (12). La región C-terminal está compuesta a su vez de dos dominios, una región extendida desde la leucina 70 a la glicina 157, y un ligando activo extendido desde lisina 158 al final de la región C-terminal (12).

Estudios de hibridación in situ y de reacción en cadena de la polimerasa, indican que el mRNA para RANKL, se expresa en cultivos de fibroblastos y en linfocitos CD4+ activados derivados de la sinovial reumatoide, como también en linfocitos CD4+ y CD8+ frescos obtenidos de sinovial reumatoide, pero no de la sinovial de Osteoarthritis(OA).(13) Resultados similares se verificaron mediante inmunohistoquímica de células cultivadas.(8,13,14) Se sabe que la expresión de RANKL en osteoblastos, aumenta en presencia de 1,25-dihidroxitamina D3, prostaglandina E2, interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), interleucina 11 (IL-11) y la hormona paratiroidea.(15) Las evidencias más fuertes sobre el papel del RANKL en la reabsorción ósea mediada por los osteoclastos en la artritis inflamatoria, vienen del trabajo realizado por Kong y sus colaboradores.(7) En este estudio se demostró que células T activadas

producían RANKL capaz de disparar directamente la osteoclastogénesis in vitro y el tratamiento con Osteoprotegerina (OPG) impidió la pérdida ósea cortical y trabecular en animales experimentales (ratones *ctla4 -/-*). En estas células, la inducción del RANKL fue dependiente de la proteína cinasa C (PKC), la fosfoinositol 3 cinasa (PI3K) y de la vía de señalización mediada por calcineurina. Itonaga y sus colaboradores demostraron que los macrófagos aislados de la sinovial reumatoide humana pueden diferenciarse en células osteoclásticas capaces de reabsorber hueso, que este proceso es dependiente de RANKL y M-CSF, y que es inhibido por OPG.(16)

Además, Romas et al, demostraron la expresión de RANKL en sitios de erosión ósea en el modelo de artritis inducida por colágeno (17). Más recientemente, Suzuki y su equipo de trabajo,(2) observaron la proliferación y diferenciación espontánea de células semejantes a osteoclastos en cultivos de membrana sinovial de pacientes con AR, sin la utilización de factores como la vitamina D3 o el M-CSF, ni de co-cultivos con células osteoblásticas estromales. Estas células tenían capacidad de reabsorber hueso y expresaron CD9 y CD68, sugiriendo su linaje monocito/macrofágico. En este estudio se encontró un mayor número de células fosfatasa ácida resistente al tartrato (denominado en inglés Tartrate-Resistant Acid Phosphatase-TRAP), positivas en la sinovial reumatoide que en la sinovial de pacientes con OA. Haynes y sus colaboradores, determinaron que se pueden generar a partir de cultivos de células provenientes de la sinovial reumatoide osteoclastos capaces de reabsorber hueso.(18) Además, mostraron que el mRNA del RANKL es expresado en las células dentro del tejido y que su inhibidor específico OPG, reduce la destrucción del hueso, pero no el número de células TRAP positivas. OPG reduce el número de células TRAP

positivas encontradas en el co-cultivo de células provenientes de sangre periférica y células derivadas de la membrana sinovial reumatoidea. Pero no inhibe el número de células TRAP positivas encontradas en células sinoviales, probablemente debido a que estas células están más diferenciadas que las de sangre periférica. Esos datos indican que el tejido sinovial contiene tanto osteoclastos maduros como sus precursores y también factores esenciales para la generación de estas células. Sin embargo, no son conocidos los estímulos que regulan la expresión de RANKL en los fibroblastos reumatoideos. Se desconoce cuáles son los ligandos que preferencialmente estimulan la expresión del RANKL en estas células, ni el papel regulatorio de hormonas calciotrópicas como la 1,25-dihidroxitamina D3 o la paratohormona. Igualmente, no se conocen las rutas de señalización que se activan a partir del acoplamiento de estos ligandos y receptores en la membrana de los fibroblastos de pacientes con AR, y que conducen a la expresión de RANKL. Alteraciones en esta vía de señalización, sea por defectos de la estructura o de la función de las moléculas participantes, podrían modificar el funcionamiento y la regulación normal de los fibroblastos en la sinovial reumatoidea, como por ejemplo, alterar salidas fisiológicas de estas células como proliferación y apoptosis, llevando a la expansión de estas células en el compartimiento sinovial de estos pacientes.

Pacientes y métodos

Se obtuvieron muestras de membrana sinovial durante la intervención quirúrgica de cinco (5) pacientes con diagnóstico de AR y de cinco (5) pacientes con OA, que cumplieron los criterios del American Collage of Rheumatology. El promedio de edad de los pacientes fue de $61.1 \pm 3,46$ años. Se aislaron los FLS del tejido sinovial de pacientes con AR y de

pacientes con OA, por medio de la digestión con colagenasa y se cultivaron en un medio modificado Tagle F12 Dulbecco (DMEM-F12) con suero fetal bovino al 20% y penicilina/estreptomina al 2%. Los estudios fueron realizados en los FLS obtenidos entre el tercero y sexto repique y la pureza de los FLS fue establecida por citometría de flujo, utilizando anticuerpos monoclonales específicos. Los FLS fueron cultivados durante 48 horas en presencia o ausencia de bFGF (100 ng/ml), PMA (10 ng/ml), IL-1 (2 ng/ml) o 1,25 hidroxivitamina D3 (15 nM). La expresión de RANKL fue medida utilizando el ensayo de Western blot con anticuerpo monoclonal de ratón anti-RANKL humano.

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado usando el test t-Student no pareado de dos colas con el programa ESTexe del laboratorio de Neurofarmacología del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Una $p < 0,05$ fue considerada estadísticamente significativa.

En un estudio realizado en nuestro laboratorio, se observaron anomalías en la señalización post-membrana en los fibroblastos de la sinovial reumatoidea en comparación con la sinovial de pacientes Osteoarthritis(OA).(19) Así los fibroblastos reumatoideos mostraron una mayor proliferación, tanto en cultivos no estimulados, como luego de activación con bFGF in vitro. Además, los fibroblastos reumatoideos mostraron una menor actividad de las MAPKs, ERK-1 y ERK-2, en respuesta a la estimulación in vitro con este factor de crecimiento.(19) Este parámetro de señalización se correlacionó negativamente con la proliferación celular, tanto en fibroblastos reumatoideos como en los provenientes de pacientes con OA. Asimismo, los fibroblastos reumatoideos mostraron una mayor fosforilación basal en tirosina de

varios substratos y respondieron pobremente a la inhibición de la fosfatasa de tirosina, cuando se compararon con fibroblastos de OA. No se sabe si los eventos tempranos de señalización, que involucran pasos bioquímicos de fosforilación en tirosina, son relevantes en la sobreexpresión de RANKL, o si la falta de expresión de la fosfatasa (Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on Chromosome Ten - PTEN), recientemente descrita por PAP y su equipo de trabajo(20), pudiera contribuir en la desregulación de la expresión de RANKL en AR. Recientemente hemos comenzado el estudio de la expresión de RANKL en fibroblastos de pacientes con Artritis Reumatoidea (AR) y comparado con la expresión en pacientes con OA, una enfermedad articular de base no inmunológica. Además, estudiamos el efecto de la estimulación de los FLS con diversos compuestos como IL-1, bFGF, PMA y vitamina D, sobre la expresión del RANKL en fibroblastos obtenidos de pacientes con AR y OA. Obtuvimos muestras de membrana sinovial durante la intervención quirúrgica de tres pacientes con diagnóstico de AR y de tres pacientes con OA. Los estudios fueron realizados en los fibroblastos obtenidos entre el tercero y el sexto pasaje. Primero, comparamos la expresión basal de RANKL en fibroblastos de pacientes con AR y OA, y luego de cultivar en presencia de medio durante 48 horas. Como se observa en la **Figura 1a**, tanto los fibroblastos de la sinovial de pacientes con AR como los fibroblastos de la sinovial de pacientes con OA, expresaron la molécula RANKL. Sin embargo, esta expresión fue mayor en los fibroblastos reumatoideos, a nivel basal como luego de cultivar durante 48 horas en medio.

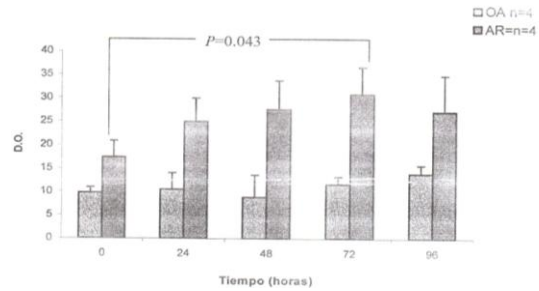


Gráfico 1a: Expresión del RANKL en FLS reumatoideos y de sinovial de OA a diferentes tipos de cultivo.



Figura 1a: Experimento representativo mostrando la expresión del RANKL en un paciente con AR y un paciente con OA a diferentes tipos de cultivo.

A los fines de examinar el papel potencial de factores de crecimiento y otros estímulos de conocida relevancia en la respuesta de fibroblastos, las células fueron cultivadas en presencia o ausencia de bFGF (100 ng/ml), PMA (10 ng/ml), IL-1 (2 ng/ml) o vitamina D (15nM). El día antes del ensayo las células fueron deprivadas de suero bovino fetal durante 12 horas, a fin de sincronizarlas en el ciclo celular. Después de la incubación con los estímulos correspondientes, los fibroblastos fueron lisados en un buffer que contenía 100mM TRIS acetato, y Triton-X-IDO al 0.1%. 50 mg de proteínas del lisado fueron corridas en un gel de electroforesis de SDS-poliacrilamida al 12% y fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Luego las membranas

fueron incubadas con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-RANKL humano. Después de tres lavados fueron incubadas con IgG antiratón conjugada con peroxidasa. Las bandas fueron examinadas por densitometría usando un densitómetro de imagen (19).

Como puede observarse en la **Figura 1b** todos los estímulos utilizados, produjeron una inhibición en la expresión del RANKL, tanto en los FLS reumatoideos, como en los fibroblastos de la sinovial de pacientes con OA, siendo el efecto más marcado con PMA y con vitamina D. Este efecto contrasta con lo observado en osteoblastos, células en las cuales estos estímulos inducen la expresión de RANKL. Pareciera que estos compuestos, necesarios para la expresión del RANKL en los osteoblastos, no lo son para la expresión del RANKL en los fibroblastos.

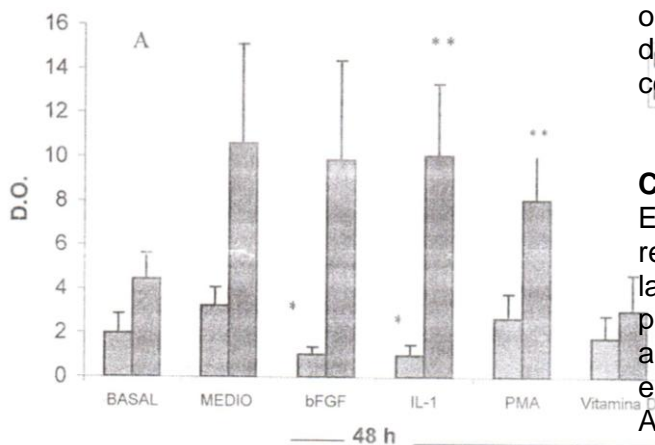


Gráfico 1b: Expresión del RANK en FLS reumatoideos y de pacientes con OA bajo diferentes condiciones de estimulación durante 48 horas. * Diferencias con respecto a medio, ($P < 0,05$). ** Diferencia con respecto a OA ($P < 0,05$). Datos expresados como media de $D.O \pm SEM$ de FSL tomados de cinco pacientes con AR y OA.

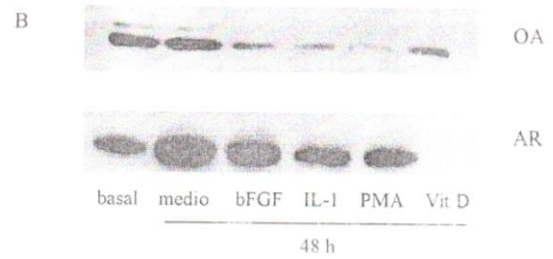


Figura 1b: Experimento representativo mostrando el efecto inhibitor de varios estímulos en la expresión del RANKL en 1 paciente con AR y un paciente con OA.

Este es el primer reporte en el que se estudia el efecto de diferentes estímulos relevantes sobre la expresión del RANKL en fibroblastos, a fin de determinar cuales factores estimulan la expresión del RANKL en fibroblastos de la sinovial reumatoide y promueven osteoclastogénesis, así como el desarrollo de erosiones en los pacientes con AR.

Conclusiones

Este estudio reafirma el papel de los FLS reumatoideos, como los componentes de las osteoclastogenesis acelerada en pacientes con AR, que se expresa con la aparición temprana de erosiones óseas en las articulaciones afectadas. Además, de forma preliminar se muestra como factores que participan en la expresión de RANKL en osteoblastos, que se sabe activan la vía de señalización post-receptor en los FLS y que llevan a un aumento de la tasa de proliferación de estas células como el bFGF, también tiene un efecto regulatorio potencial en la expresión de RANKL en los FSL.

Bibliografía

1. **Firestein G.S.** Etiology and Pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: Textbook of Rheumatology. Sixth Edition, Editado por S. Ruddy, E. Harris, C. Sledge. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 2001.
2. **Suzuki Y., Tsutsumi Y., Nakagawa M., Suzuki H., Matsushita K., Beppu M., et al.** Osteoclast-like cells in a in vitro model of bone destruction by rheumatoid synovium. *Rheumatology* 2001; 40:673-682.
3. **Franz J.K., Pap T., Muller-Ladner U., Gay R.E., Burmester G.R., Gay S.** T-cell independent joint destruction. In: T cell in arthritis. Editado por P Miossec, GS Firestein. Birkenhauser, 1998.
4. **Fassbender H.G.** Histomorphological basis of articular cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Coll Relat Res* 1983; 3:141-155.
5. **Lafyatis R., Remmers E.F., Roberts A.B., Yocum D.E., Sporn M.B., Wilder R.L.** Anchorageindependent growth of synoviocytes from arthritic and normal joints. Stimulation by exogenous platelet-derived growth factor and inhibition by transforming growth factor-beta and retinoids. *J Clin Invest* 1989; 83:1267-1276.
6. **Takayanagi H., Lizuka H., Jujuy T., Nakagawa T., Yamamoto A., Miyazaki T., et al.** Involvement of receptor activator of nuclear factor kB ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43:259-269.
7. **Kong Y.Y., Feige U., Sarosi I., Bolon B., Tafuri A., Morony S., et al.** Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 1999; 402:304-309.
8. **Shigeyama Y., Pap T., Kunzler P., Simmen B.R., Gay R.E., Gay S., et al.** Expression of osteoclast differentiation factor in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43:2523-2530.
9. **Simonet W.S., Lacey D.L., Dunstan C.R., Kelley M., Chang MS., Luthy R., et al.** Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89:309-319.
10. **Yasuda H., Shima N., Nakagawa N., Yamaguchi K., Kinosaki M., Mochizuki S.I., et al.** Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 1998; 139:1329-1337.
11. **Yamaguchi B., Kinosaki M., Goto K., Kobayashi F., Tsuda E., Mochizuki S., et al.** Characterization of structural domain of human osteoclastogenesis inhibitory factor. *J Biol. Chem* 1998; 273:5117-5123.
12. **Lacey D.L., Timms E., Tan H.L., Kelley L., Dunstan M.J., Burgess T., et al.** Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; 93:165-176.
13. **Gravallese E.M., Manning C., Tsay A., Naito A., Pan C., Amento E., et al.** Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis Rheum* 2000; 43:250-258.
14. **Horwood N.J., Kartsogiannis V., Quinn J.M.W., Romas E., Martin T.J., Gillespie M.T.** Activated T lymphocytes support osteoclast formation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 265:144-150.

15. **Yasuda H., Shima N., Nakagawa N., Yamaguchi K., Kinosaki M., Mochizuki S.I., et al.**

Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95:3597-3602.

16. **Itonaga I., Fujikawa Y., Sabokbar A., Murray D.W., Athanasou N.A.**

Rheumatoid arthritis synovial macrophage-osteoclast differentiation is osteoprotegerin ligand-dependent. J Pathol 2000; 192:97-104.

17. **Romas E., Bakharevski O., Hards D.K., Kartsogiannis V., Quinn J.M., Ryan P.F., et al.**

Expression of osteoclast differentiation factor at sites of bone erosion in collagen-induced arthritis. Arthritis Rheum 2000; 43:821-826.

18. **Haynes D.R., Crotti T.N., Loric M., Bain G.I., Atkins G.J., Findlay D.M.**

Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kB ligand (RANKL) regulate osteoclast formation by cells in the human rheumatoid arthritic joint. Rheumatology 2001; 40:623-630.

19. **López-Benítez C.M., Placeres F.A., Alonzo E.J., Rodríguez M.A.**

Papel patogénico de los fibroblastos en la membrana sinovial de pacientes con artritis reumatoide. Revista de la Facultad de Medicina 2001; 24:42-46.

20. **Pap T., Franz J.K., Hummel K.M., Jeisy E., Gay R., Gay S.**

Activation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis: lack of expresión of the tumour suppressor PTEN at sites of invasive growth and destruction. Arthritis Res 2000; 2:59-65.