



Alterazione del potenziale osteogenico in osteoblasti ottenuti da soggetti affetti da malattia parodontale: ruolo dei recettori apoptotici per trail

**F. Ciccolella, G. Brunetti*, A. Oranger*, P. Pignataro, M. Coricciati,
S. Colucci*, M. Grano*, F.R. Grassi**

*Dipartimento di Odontostomatologia, Cattedra di Parodontologia, *Dip. di Anatomia Umana
e Istologia - Università degli Studi di Bari*

ATTI DELLA SESSIONE DI RICERCA PREMIO "HENRY M. GOLDMAN" - 2006

RIASSUNTO

Il presente lavoro dimostra che nella malattia parodontale (MP) gli osteoblasti (OBs) presentano un deficit osteogenico ed una maggior suscettibilità all'apoptosi indotta da una citochina apoptotica, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL).

INTRODUZIONE

La MP è una patologia infiammatoria caratterizzata da fenomeni osteolitici del processo alveolare legati ad un alterato rimodellamento osseo, per un'elevata attività osteoclastica e una ridotta attività rigenerativa osteoblastica, dovuto a meccanismi non ancora del tutto noti. In un nostro recente lavoro abbiamo dimostrato che nella MP, il riassorbimento osseo è stimolato dai linfociti T attivati, attraverso l'over-espressione di citochine osteoclastogeniche quali RANKL e TNF- α ⁽¹⁾. Tuttavia, in letteratura mancano dati riguardanti l'attività degli OBs nella malattia parodontale. Pertanto nella prima parte del nostro lavoro abbiamo valutato le capacità osteogeniche di popolazioni di OBs ottenuti per espianato da frammenti di osso alveolare prelevati da Pp durante procedure di chirurgia estrattiva. Sulle stesse cellule è stata anche valutata l'influenza di una citochina appartenente alla famiglia dei tumor necrosis factor (TNF) e coinvolta nel processo di apoptosi, TRAIL, in quanto il ridotto grado di rigenerazione ossea può essere dovuto anche ad un aumento della mortalità cellulare. TRAIL è espresso in diversi tipi di cellule (linfociti T, monociti circolanti, cellule dendritiche e NK) ed è presente in diversi tessuti (milza, polmoni, prostata, ovaie, ecc.) ⁽²⁾. TRAIL può indurre apoptosi attraverso il legame con i recettori DR4 e

DR5, ma può anche interagire con recettori “Decoy” con funzione antiapoptotica, DcR1 e DcR2, che mancando del dominio di morte, non trasducono il segnale apoptotico ⁽³⁾. In particolare, l’apoptosi indotta da TRAIL dipende dal rapporto tra i recettori di morte e i recettori “Decoy” che la cellula esprime. Pertanto nella seconda parte di questo lavoro abbiamo valutato l’espressione dei recettori di TRAIL nelle popolazioni di OBs da Pp e la sensibilità delle stesse cellule all’apoptosi indotta da questo.

MATERIALI E METODI

Pazienti

Lo studio ha preso in esame 20 Pp e 20 controlli (età media 52.8 ± 11.2) i quali, opportunamente informati, hanno rilasciato il loro consenso firmato. I pazienti inclusi nello studio non mostravano altri disordini scheletrici e i controlli evidenziavano un’ottima salute parodontale senza segni di infiammazione gengivale e di perdita di attacco parodontale. Tutti i soggetti scelti non hanno ricevuto alcun trattamento farmacologico. La valutazione clinica della malattia parodontale è stata fatta considerando Indice di Placca, Indice Gengivale ⁽⁴⁾ ed evidenze radiografiche di riassorbimento osseo.

Culture Cellulari di OBs Umani

Questi campioni sono stati puliti dai tessuti molli, lavati con terreno di coltura α -MEM e digeriti con collagenasi per 30 minuti a 37°C. Le varie componenti sono state separate: le cellule ossee non aderenti sono state allontanate e i frammenti di osso sono stati trasferiti in una fiasca con α -MEM addizionato di siero, cambiando il terreno di coltura ogni tre giorni. Dagli espunti nel giro di due settimane fuoriescono OBs che proliferano nella fiasca. Le cellule sono state caratterizzate istochimicamente come OBs mediante colorazione istochimica per la fosfatasi alcalina.

Fosfatasi alcalina

La fosfatasi alcalina è stata valutata istochimicamente e biochimicamente su OBs trattati con Acido Ascorbico e Dexametasone per 5 e 10 gg. La colorazione istochimica delle cellule è stata effettuata con un kit disponibile commercialmente (Sigma, Milano) alla confluenza, a 5 e 10 giorni di trattamento differenziante.

Sintesi di noduli di matrice mineralizzata

La potenzialità di sintesi di noduli di matrice mineralizzata è stata valutata su OBs stimolati alla produzione e alla mineralizzazione della matrice con terreno addizionato con 50 $\mu\text{g/ml}$ di Acido Ascorbico, β -glicerolfosfato 10^{-2} M e Dexametasone 10^{-8} M per 5 settimane. Le colture sono state fissate e colorate

dopo 5 settimane di trattamento. I noduli di matrice mineralizzata sono stati colorati utilizzando la colorazione Von Kossa.

Estrazione di RNA e reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Gli OBs isolati da donatori sani e pazienti affetti da malattia parodontale sono stati coltivati in α -MEM addizionato di FCS al 10% fino alla confluenza, e con terreno osteogenico per 5 e 10 giorni. A questi tempi, gli OBs sono stati processati per l'estrazione di RNA. Le reazioni di amplificazione sono state eseguite per i seguenti geni: DR4, DR5, DcR1, DcR2, e il gene di controllo Gliceraldeide fosfato deidrogenasi (GAPDH) mediante Platinum *Taq* DNA polymerase. I prodotti di PCR sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio e le bande sono state rivelate usando un sistema Video CCD.

Western Blot

Gli OBs isolati da donatori sani e pazienti affetti da malattia parodontale sono stati coltivati in α -MEM addizionato di FCS al 10% fino alla confluenza, e con terreno osteogenico per 5 e 10 giorni. A questi tempi, gli OBs sono stati processati per l'estrazione di proteine, utilizzando un tampone di lisi [50 mmol/l TRIS-HCl (pH 8.0), 150 mmol/l NaCl, 5 mmol/l EDTA, 1% NP40 e 1 mmol/l PMSF]. In seguito 50 μ g di proteine per ogni campione sono stati caricati su un gel di acrilammide, trasferiti su membrane di nitrocellulosa e incubati con anticorpi primari anti-DcR1, DcR2, DR4 e DR5 e anticorpi secondari coniugati alla perossidasi. Le bande sono state rivelate attraverso un kit di chemiluminescenza.

Test per la determinazione della vitalità cellulare

Gli OBs isolati da Pp e controlli sono stati trattati con terreno osteogenico e concentrazioni crescenti di TRAIL comprese tra 10-500 ng/ml per 24-48 ore mentre alcune colture usate come controllo non hanno avuto trattamento. La vitalità cellulare è stata valutata utilizzando 3-(4,5-dimetiltiazolidil-2)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT).

ELISA

La concentrazione di TRAIL nei sieri dei Pp e dei controlli è stata misurata tramite kit ELISA (TRAIL Kit, Biomol Research Laboratories, Inc., Plymouth Meeting, PA, USA). I risultati sono espressi come media \pm SE. I confronti tra i due gruppi sono stati eseguiti tramite il *t* test.

RISULTATI

Espressione della fosfatasi alcalina in OBs isolati da Pp

L'enzima fosfatasi alcalina è stata valutata istochimicamente e biochimicamente in OBs alla confluenza e in OBs coltivati in condizioni differenzianti per 5 e 10 giorni. La colorazione istochimica ha evidenziato una minore espressio-

ne dell'enzima negli OBs ottenuti da Pp rispetto alle colture da controlli, riduzione più evidente nel corso della differenziazione (Fig. 1A). Parallelamente, la valutazione dell'attività della fosfatasi alcalina ha evidenziato una significativa riduzione dell'attività dell'enzima nei campioni provenienti da Pp rispetto ai controlli, anch'essa sempre più evidente con l'incremento a 5 e 10 giorni delle cellule differenziate (Fig.1B).

Formazione di noduli di matrice mineralizzata in colture di OBs isolati da Pp

La capacità di sintesi di noduli di matrice è stata valutata in colture di OBs isolati da Pp e controlli, trattate per 5 settimane con fattori osteogenici. In entrambi le colture si è avuta la formazione dei noduli, ma negli OBs isolati da Pp si è evidenziata una capacità mineralizzante, indicata come percentuale di area mineralizzata, molto modesta in confronto alle colture da controlli (Fig. 1C).

Espressione dei recettori di TRAIL in colture di OBs isolati da Pp

Abbiamo inoltre pensato che la mancata rigenerazione dell'osso alveolare nella parodontopatia potrebbe essere spiegata anche con una maggiore sensibilità all'apoptosi degli OBs isolati da Pp rispetto alle stesse cellule isolate da controlli. Pertanto, abbiamo valutato l'espressione dei recettori di morte, DR4 e DR5, e dei recettori "decoy", DcR1 e DcR2 in colture di OBs isolati da Pp e controlli mediante Western blot e RT-PCR. Sia nelle colture dei controlli che dei Pp risultano espressi, e restano costanti con la differenziazione, entrambi i recettori di morte e il recettore DcR1. Invece, si ha una minore espressione di DcR2 nei Pp rispetto ai controlli, e la sua espressione subisce solo piccole variazioni nel corso della differenziazione (Figg. 2A-B).

Sensibilità degli OBs all'azione apoptotica di TRAIL

L'azione apoptotica di TRAIL è stata valutata in colture di OBs isolati da Pp e controlli. Dopo 24h di esposizione, negli OBs da Pp, si osserva una diminuzione dose dipendente della vitalità cellulare già con 10 ng/ml di TRAIL. Nei controlli, invece, l'azione apoptotica di TRAIL si esplica solo con dosi pari a 100 e 500 ng/ml, con una percentuale di cellule apoptotiche del 50% rispetto all'80% della coltura da Pp. Dopo 48 h gli OBs isolati dai controlli si mostrano sensibili alla concentrazione di 50 ng/ml ed alla concentrazione di 500 ng/ml non superano il 50% di cellule apoptotiche. Nei Pp tale percentuale si ottiene già alla concentrazione di 10 ng/ml, raggiungendo l'80% a 50 ng/ml.

Livelli sierici di TRAIL

Tramite ELISA abbiamo misurato i livelli sierici di TRAIL nei Pp e nei controlli. In particolare, i risultati hanno evidenziato un significativo aumento dei livelli di TRAIL nei sieri dei parodontopatici (851 ± 221 pg/ml, range 470-1236) rispetto ai controlli (389 ± 247 pg/ml, range 100-806), $p < 0.001$. Questi dati indicano un possibile ruolo di TRAIL nella MP.

DISCUSSIONE

Il rimodellamento osseo è un processo dinamico, con stadi alterni di deposizione e riassorbimento regolati da fattori sistemici e fattori locali. Tutti questi fattori regolano la proliferazione, la differenziazione e l'attività degli osteoclasti e degli OBs nei processi di rimodellamento. Nel nostro studio abbiamo valutato i parametri determinanti il fenotipo osteoblastico in esperimenti paralleli su OBs isolati da Pp e da controlli non in cura con farmaci attivi sul metabolismo osseo. I risultati hanno dimostrato che, a parità di numero di cellule, le colture da Pp sono caratterizzate da una minor espressione del fenotipo osteoblastico, considerando l'espressione e l'attività dell'enzima fosfatasi alcalina e la capacità di sintesi di noduli di matrice mineralizzata. Inoltre, abbiamo valutato anche la sensibilità all'azione apoptotica di TRAIL sia nelle colture di OB isolati da Pp che nelle stesse cellule isolate da controlli. In particolare, alcuni Autori hanno dimostrato che in condizioni fisiologiche gli OBs esprimono i recettori di TRAIL, ma non sono sensibili alla sua azione apoptotica⁽⁵⁾. Invece, studi effettuati in condizioni patologiche, come nel Mieloma Multiplo⁽⁶⁾ e in colture di OBs infettati da *Staphylococcus Aureus*⁽⁷⁾, dimostrano che gli OBs sono sensibili all'effetto apoptotico di TRAIL. Nel nostro studio su colture di OBs isolati da Pp e da controlli abbiamo determinato, tramite RT-PCR e Western blot, che l'espressione del recettore DcR2 è inferiore negli OBs da Pp. Questi dati indicano che la sensibilità all'azione citotossica di TRAIL potrebbe essere incrementata dalla perdita dei meccanismi di protezione indotta dalla MP. Inoltre, i risultati ottenuti dai test di esposizione diretta a TRAIL mostrano una maggiore sensibilità all'effetto apoptotico degli OBs isolati da Pp già a concentrazioni molto basse, effetto supportato in vivo dagli elevati livelli di questa citochina nel siero dei pazienti. In conclusione, quindi, la ridotta capacità rigenerativa dell'osso alveolare nella MP potrebbe essere attribuita sia ad un difetto nella funzionalità degli OBs sia alla spiccata sensibilità all'azione apoptotica di TRAIL.

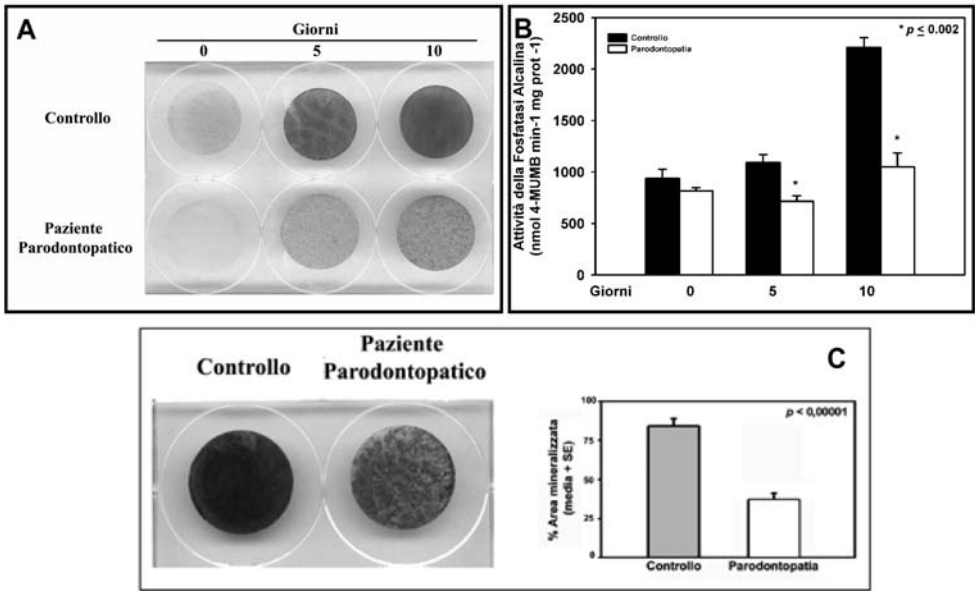


FIGURA 1 - Valutazione dei markers espressi da osteoblasti differenziati isolati da pazienti parodontopatici e controlli. La fosfatasi alcalina è stata valutata, con metodo istochimico (A) e biochimico (B) in colture di osteoblasti ottenuti da frammenti di osso prelevati da pazienti parodontopatici e da controlli. Gli esperimenti sono stati eseguiti quando le cellule avevano raggiunto la confluenza e dopo 5 e 10 giorni di coltura in un mezzo osteogenico. L'espressione dell'enzima risulta ridotta nelle colture di osteoblasti provenienti da pazienti parodontopatici. La capacità di sintesi di noduli di matrice mineralizzata è stata valutata su colture di osteoblasti isolati da frammenti di osso prelevati da controlli e da pazienti affetti da parodontopatia, dopo 5 settimane di coltura in un mezzo osteogenico. (C) La formazione di noduli di matrice mineralizzata da parte degli osteoblasti prelevati da pazienti parodontopatici è notevolmente ridotta rispetto ai controlli. L'istogramma mostra la percentuale di area mineralizzata, nelle colture isolate da controlli rispetto a quelle isolate da pazienti parodontopatici

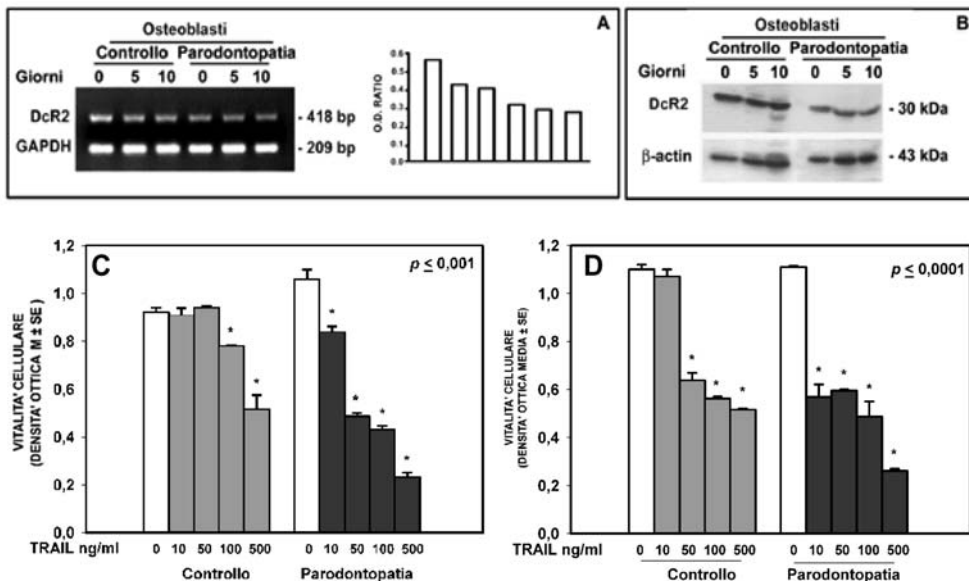


FIGURA 2 - Espressione di DcR2 e effetto di TRAIL su osteoblasti provenienti da pazienti affetti da parodontopatia e da controlli. Gli osteoblasti ottenuti da frammenti prelevati da pazienti affetti da parodontopatia e da controlli sono stati testati per l'espressione di DcR2 tramite RT-PCR (A) e Western-blot (B). L'intensità delle bande è stata quantificata tramite densitometria; i grafici rappresentano la densità ottica (OD) di DcR2 normalizzati rispetto alla densità ottica di GAPDH (OD ratio) di un esperimento rappresentativo (A). L'espressione di DcR2 risulta ridotta nelle popolazioni di osteoblasti provenienti da pazienti parodontopatici. Gli osteoblasti isolati da controlli e da pazienti parodontopatici sono stati trattati in presenza di concentrazioni crescenti di TRAIL, range 10-500 ng/ml, per 24 (C) e 48 (D) ore, e poi analizzati mediante MTT per valutare la vitalità cellulare. I risultati mostrano una maggior sensibilità all'azione di TRAIL degli osteoblasti provenienti da pazienti parodontopatici

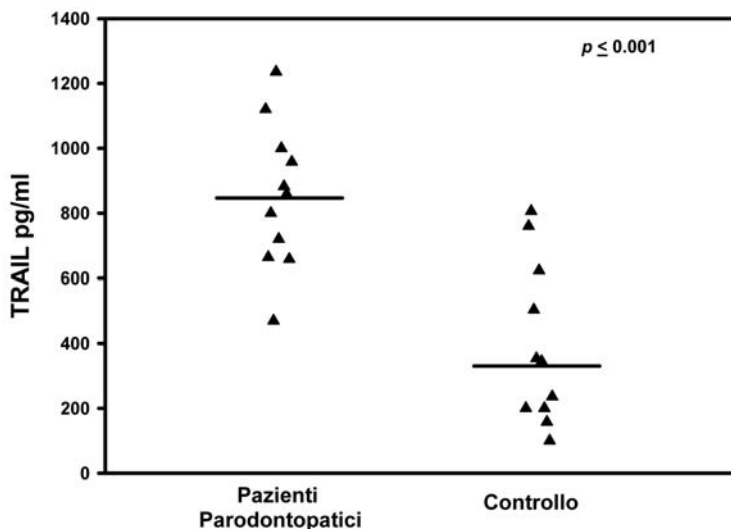


FIGURA 3 - Livelli sierici di TRAIL in pazienti affetti da parodontopatia. I livelli di TRAIL nel siero dei pazienti affetti da parodontopatia e dei controlli sono stati analizzati tramite ELISA. TRAIL è stato misurato in campioni di siero ottenuti da 10 pazienti affetti da malattia parodontale e da 10 controlli di età e sesso sovrapponibili. I livelli medi di TRAIL in pazienti con parodontopatia sono più elevati rispetto al gruppo di controllo, rispettivamente 851 ± 221 pg/ml (range 470-1236) e 389 ± 247 pg/ml (range 100-806) nel gruppo di controllo ($P < 0.001$).

BIBLIOGRAFIA

- 1) Brunetti G, Colucci S, Pignataro P, Coricciati M, Mori G, Cirulli N, Zallone A, Grassi FR, Grano M. T cells support the osteoclastogenesis in an in vitro model derived from human periodontitis patients. *J Periodontol* 2005; 76(10): 1675-80.
- 2) Fiumara P, Younes A. CD40 ligand (CD154) and tumour necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (Apo-2L) in haematological malignancies. *Br J Haematol* 2001; 113(2): 265-274.
- 3) Bouralexis S, Findlay DM, Evdokiou A. Death to the bad guys: targeting cancer via Apo2L/TRAIL. *Apoptosis* 2005;10(1): 35-51.
- 4) Silness J., Loe H. Periodontal disease in pregnancy. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontologica Scandinavica* 1964; 22: 112-135.
- 5) Atkins GJ, Bouralexis S, Evdokiou A, Hay S, Labrinidis A, Zannettino, Haynes DR, Findlay DM. Human osteoblasts are resistant to Apo2L/TRAIL-mediated apoptosis. *Bone* 2002; 31: 448-456.
- 6) Silvestris F, Cafforio P, Tucci M, Grinello D, Dammacco F. Upregulation of osteoblast apoptosis by malignant plasma cells: a role in myeloma bone disease. *Br J Haematol* 2003; 122: 39-52.
- 7) Alexander EH, Rivera FA, Marriot I, Anguita J, Bost KL, Hudson MC. Staphylococcus aureus-induced tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand expression mediates apoptosis and caspase-8 activation in infected osteoblasts. *BMC Microbiol* 2003; 3: 5-15.