

Acción anti-apoptótica de un calostro bovino en un modelo celular de osteoporosis



Martín-Aragón S,¹ Bermejo-Bescós P,¹ Benedí J,¹ Raposo C,^{1,2} Marques F,³ Gkiata P,⁴ Koutedakis Y,^{4,5} Ntina G,⁶ Amorim T,³ Prieto P.²

¹ Departamento de Farmacología, Farmacognosia y Botánica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid (UCM), Spain; ² SALURIS, Madrid, Spain; ³ UCIBIO/REQUIMTE, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Portugal; ⁴ University of Thessaly, Karies, Trikala, Greece; ⁵ Wolverhampton University, Walsall WV1 1LY, UK; ⁶ BME, Biomechanical Solutions, Karditsa, Greece

Justificación y objetivo del estudio

La osteoporosis inducida por glucocorticoides es una de las formas secundarias más comunes de osteoporosis, debida en parte a la apoptosis de osteoblastos y osteocitos [1].

En el presente trabajo, se han investigado los efectos anti-apoptóticos de un calostro bovino en un modelo celular de osteoporosis obtenido a partir de la exposición de células osteoblásticas MC3T3-E1 a la dexametasona (DEX).

Se determinó la **activación de caspasa-3** para evaluar el grado de apoptosis de los osteoblastos tratados con DEX y su posible prevención mediante el co-tratamiento con calostro.

Se midieron los **niveles de glutatión reducido (GSH)** para determinar si el estrés oxidativo por DEX se veía disminuido por el tratamiento con calostro.

Mediante Western-blot, se determinaron los niveles de las **proteínas p-ERK1/2, Bcl-XL, Bax y Hsp70** tras la exposición a DEX o DEX más calostro para conocer las vías de señalización responsables de la protección de los osteoblastos.

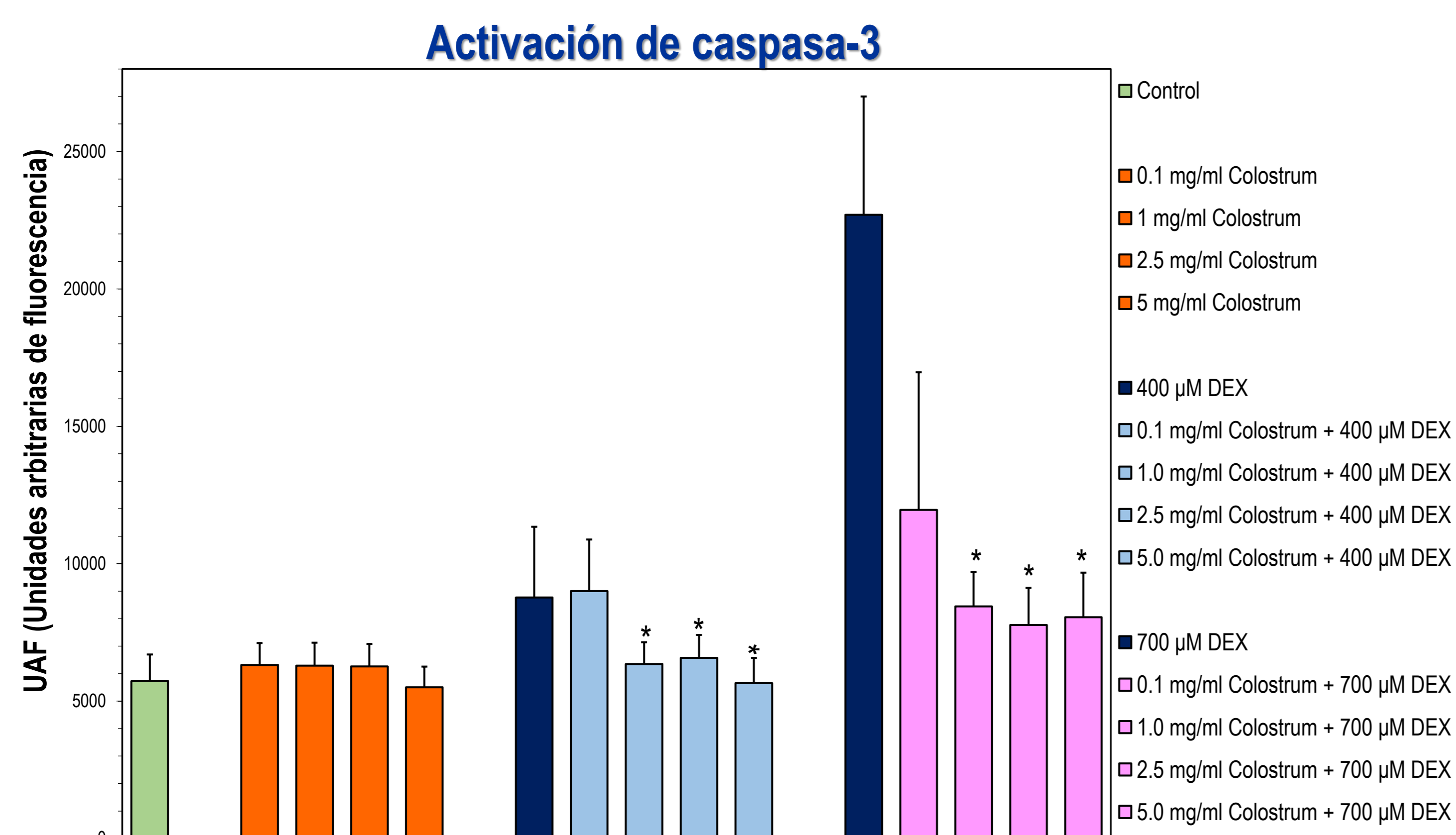


Fig. 1. La activación de caspasa-3 inducida por DEX es atenuada por tratamiento con calostro. *Diferencias significativas de las células tratadas con calostro + 400 µM DEX o con calostro + 700 µM DEX frente a las células tratadas con DEX (test de Newman-Keuls, **p* < 0,05 frente a las células tratadas con DEX).

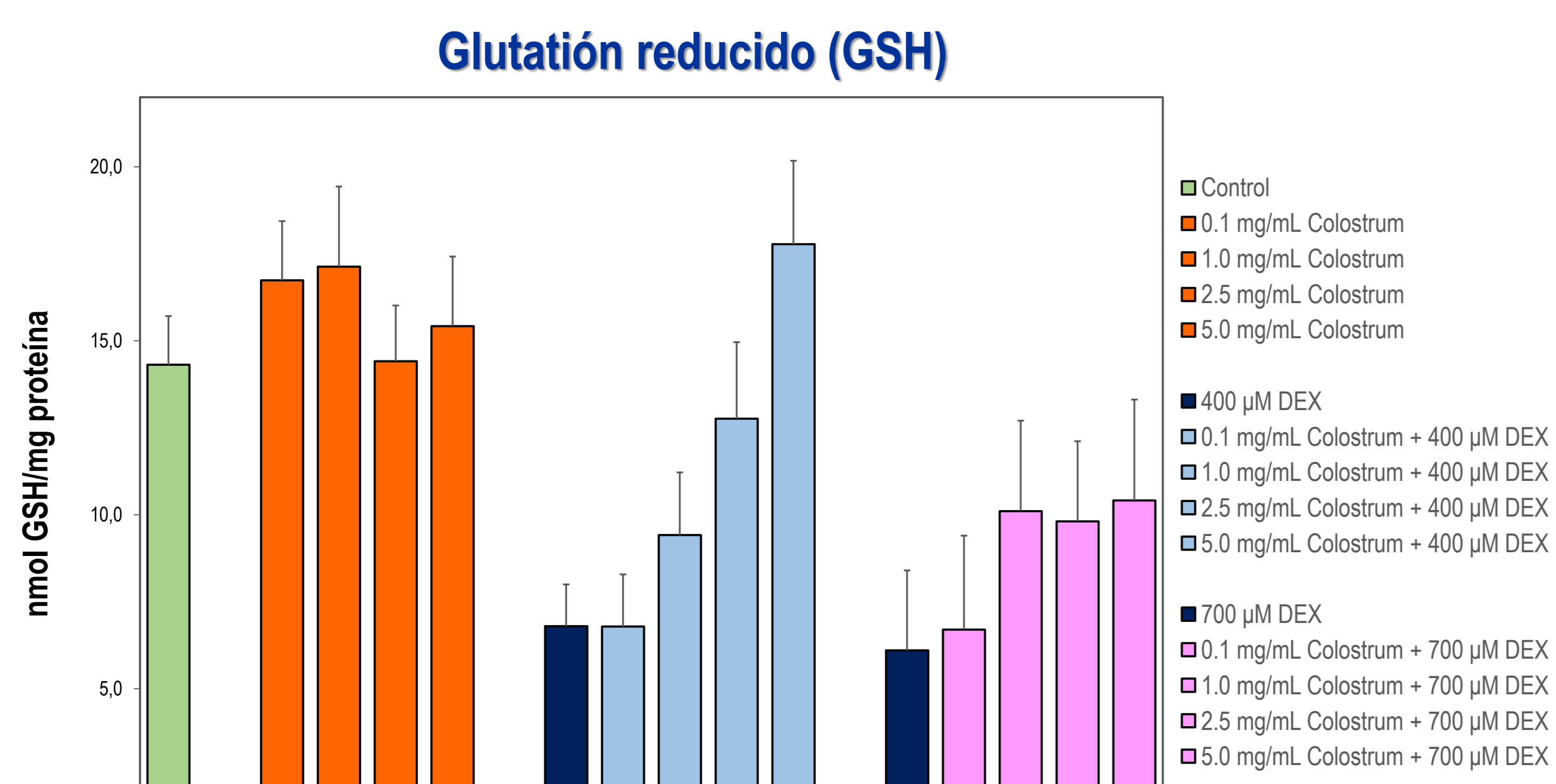


Fig. 2. El tratamiento con calostro restaura los niveles de GSH en las células MC3T3-E1 tratadas con DEX. *Diferencias significativas del tratamiento calostro + 400 µM DEX frente al tratamiento con 400 µM DEX (test de Newman-Keuls, **p* < 0,05).

Calostro bovino

Se siguieron las directrices de la Comisión Europea (Reglamento nº 1662/2006 y nº 1663/2006) para la obtención de un calostro bovino libre de patógenos. Se recogió el calostro de vacas 4-8 h tras el parto, se sometió a liofilización y posteriormente a pasteurización (exposición a 72°C durante 15 s y posteriormente a 63°C durante 30 min).

Acknowledgements

This work was supported by the MSCA-RISE - Marie Skłodowska-Curie Research and Innovation Staff Exchange (RISE) grant funded by the European Union (Grant agreement ID: 778277).

Bibliografía

- Compston, J. Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update. *Endocrine* 2018, 61, 7–16.
- Mussano et al. Presence of osteoinductive factors in bovine colostrum. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2014, 78, 662–671.

Cultivo de la línea celular de osteoblastos MC3T3-E1 de ratón

La línea celular de osteoblastos MC3T3-E1 de ratón se cultivó en medio de cultivo α-MEM sin ácido L-ascórbico y gentamicina. Se mantuvieron in vitro suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM de glutamina y 50 µg/mL a 37°C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5%.

Tratamiento celular

Durante la fase de crecimiento logarítmico, las células MC3T3-E1 se incubaron con DEX durante 24 h, o con calostro durante 1 h más un periodo adicional de 24 h en co-tratamiento con DEX, en medio de cultivo con un 1,0% de suero bovino fetal. Las concentraciones ensayadas del calostro (0.1, 1.0, 2.5 y 5.0 mg/ml) se basaron en el trabajo de Mussano et al. [2].

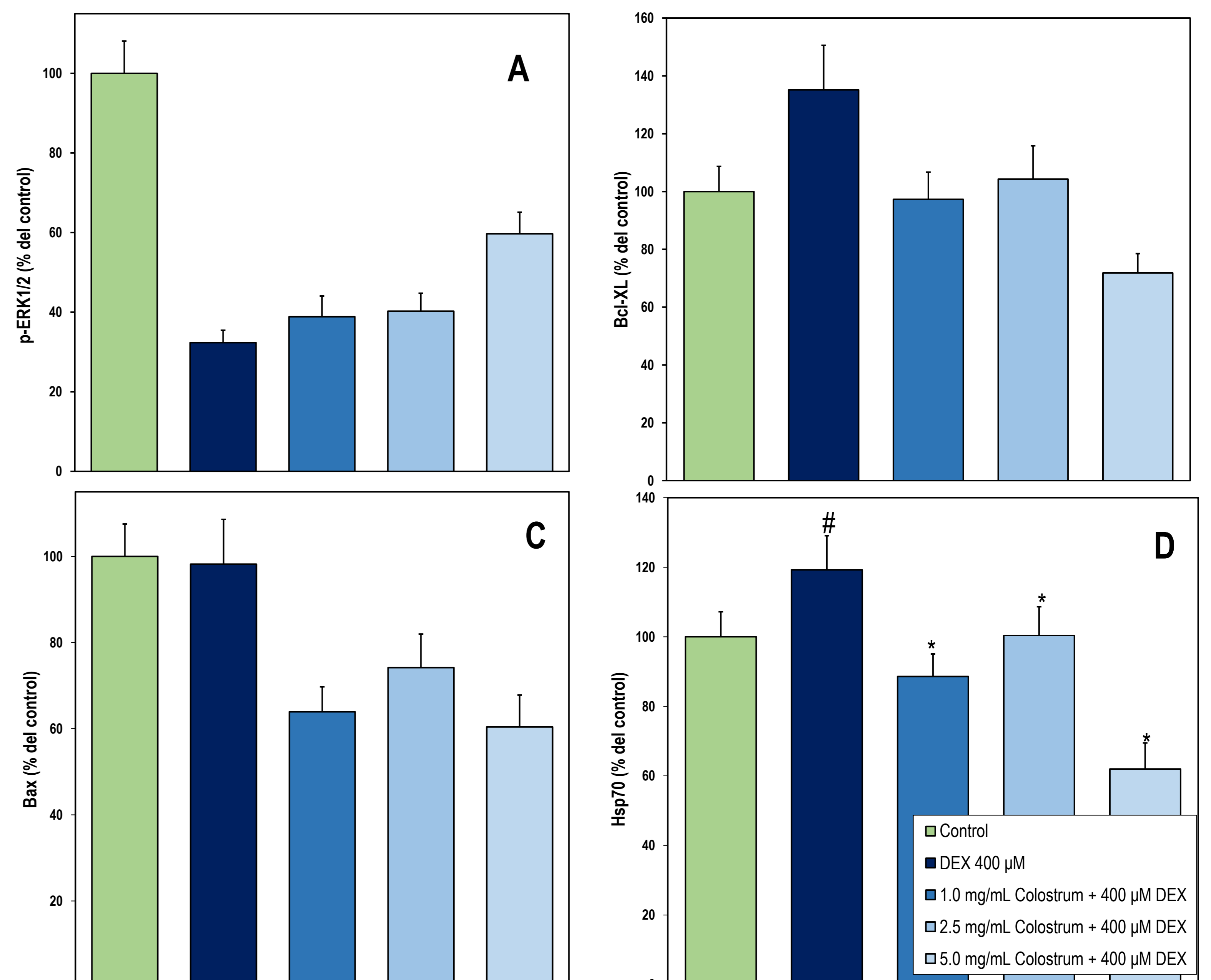
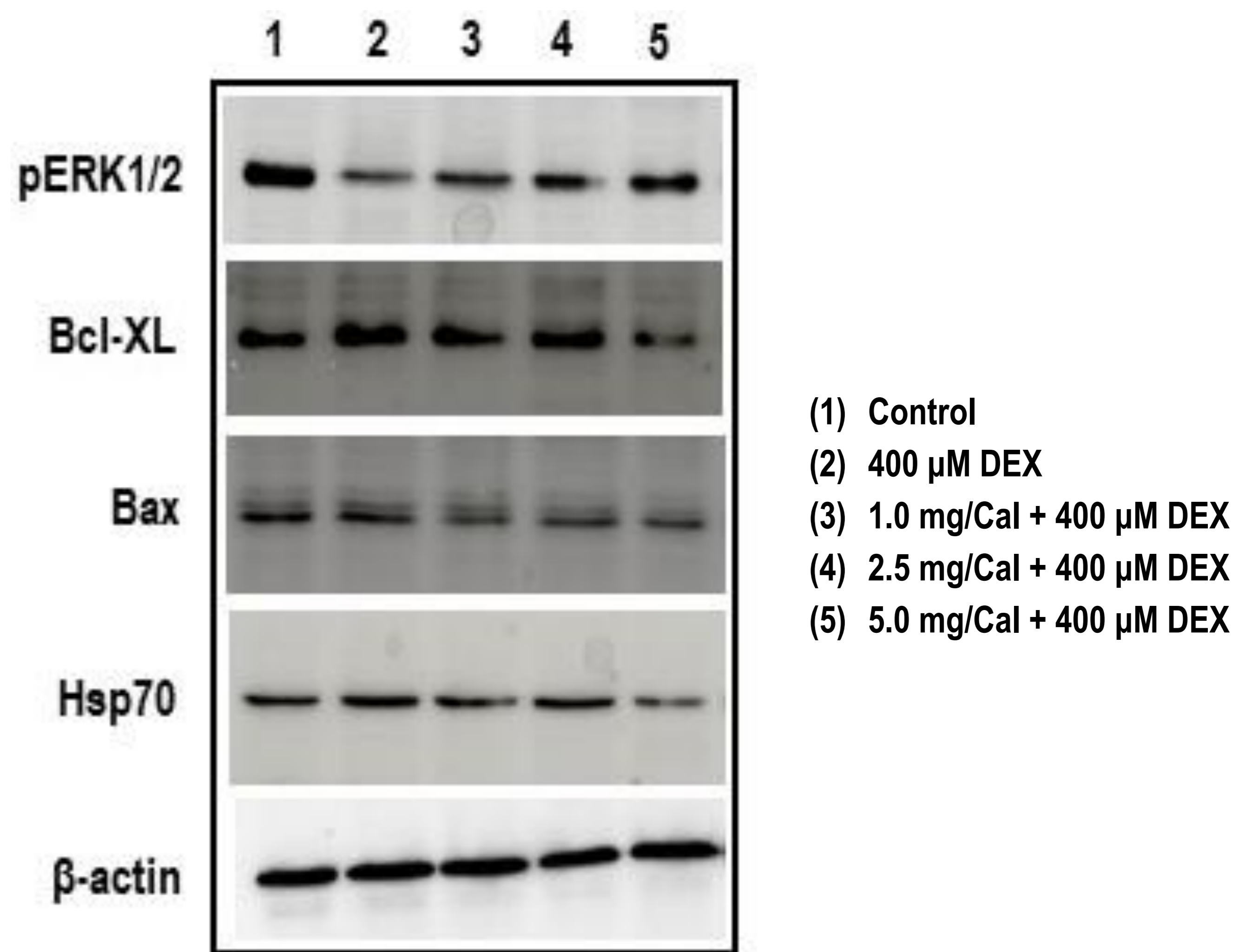


Fig. 3. Efecto del calostro en los niveles de p-ERK1/2, Bcl-XL, Bax y Hsp70 en células MC3T3-E1 tratadas con DEX. Los niveles de p-ERK1/2 (A), Bcl-XL (B), Bax (C) y Hsp70 (D), determinados por Western-blot, se representan como porcentajes relativos del control tras su normalización con β-actina. *Diferencias significativas del tratamiento con calostro + 400 µM DEX frente al tratamiento con 400 µM DEX (test de Newman-Keuls, **p* < 0,05). #Diferencias significativas de las células tratadas con 400 µM DEX frente a las células control (test de Newman-Keuls, #*p* < 0,05).

Conclusión

El calostro bovino ensayado previene la activación de caspasa-3 y el estrés oxidativo inducidos por la exposición de las células a DEX. Las células sometidas a un tratamiento conjunto de calostro y DEX mostraron mayores niveles de p-ERK1/2 y menores niveles de Bcl-XL, Bax y Hsp70. Estos resultados prueban que este calostro posee capacidad reductora de la apoptosis inducida por DEX, posiblemente a través de la activación de la vía ERK y la modulación del sistema Hsp70.