

# Influencia del oxígeno a alta concentración en cámara hiperbárica sobre el metabolismo óseo

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2020000100005>

Salmón-González Z<sup>1</sup>, Anchuelo J<sup>2</sup>, Borregán JC<sup>3</sup>, Del Real A<sup>1</sup>, Sañudo C<sup>1</sup>, García Ibarbia C<sup>1</sup>, Pérez Nuñez MI<sup>4</sup>, Riancho JA<sup>1</sup>, Valero C<sup>1</sup>

1 Servicio de Medicina Interna

2 Servicio de Oncología Radioterápica

3 Servicio de Medicina Intensiva

4 Servicio de Traumatología y Ortopedia

Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Instituto de Investigación Valdecilla (IDIVAL). Universidad de Cantabria. Santander (España)

Fecha de recepción: 08/01/2020 - Fecha de aceptación: 24/02/2020

Trabajo premiado con una beca FEIOMM de Investigación Clínica 2015

## Resumen

**Objetivos:** Conocer las acciones del oxígeno a alta concentración en cámara hiperbárica (CH) sobre la expresión de genes relacionados con el metabolismo óseo en líneas celulares osteoblásticas y hueso trabecular humano.

**Material y métodos:** Se analizó la expresión diferencial de varios genes relacionados con el metabolismo óseo (SOST, RUNX2, MMP14, OPG, HIF-1 $\alpha$  y SIRT1) en dos líneas celulares osteoblásticas humanas (Saos y Super-Saos) y en fragmentos de hueso trabecular humano sometidos a una, tres o cinco sesiones de CH (90 minutos, oxígeno 100%; 2,3 atmósferas). En cada experimento se utilizó un control que no recibió CH.

**Resultados:** No encontramos diferencias significativas tras la CH en la expresión de los genes estudiados, ni en las células ni en hueso trabecular. Solo en la línea celular Super-Saos la expresión de OPG tras 5 sesiones de CH descendió 6 veces con respecto a la del grupo control ( $2^{-\Delta Ct}$  de 72;  $p=0,01$ ).

**Conclusiones:** El oxígeno a alta concentración en cámara hiperbárica no parece tener influencia en la expresión de genes relacionados con el metabolismo óseo.

**Palabras clave:** oxígeno, cámara hiperbárica, hueso, genes.

## INTRODUCCIÓN

El oxígeno es necesario para la producción de energía celular y está implicado en numerosos procesos, como la activación enzimática, la señalización molecular y la regulación de la expresión de genes<sup>1</sup>. También en la angiogénesis, el mantenimiento de las células madre hematopoyéticas y la formación ósea<sup>2</sup>. De hecho, cambios en la presión parcial de oxígeno pueden influir en la función de los osteoblastos y osteoclastos<sup>3</sup>. En hipoxia desciende la formación y la mineralización del hueso, mientras que aumenta la resorción<sup>4-6</sup>. En sentido contrario, la hiperoxia podría tener un efecto beneficioso para el hueso. El tratamiento con oxígeno a alta concentración en cámara hiperbárica (CH) ha demostrado su utilidad en la osteomielitis y la osteonecrosis de mandíbula causada por radioterapia o por el uso de bisfosfonatos<sup>7-9</sup>. La CH acelera la diferenciación osteogénica de células mesenquimales y disminuye la activación de osteoclastos<sup>10-12</sup>.

En este trabajo hemos querido analizar las acciones del oxígeno a alta concentración en CH sobre la expresión de genes relacionados con el metabolismo óseo en líneas celulares osteoblásticas y hueso humano<sup>5,6,13,14</sup>.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Líneas celulares

Se utilizaron dos líneas celulares osteoblásticas Saos-2 y Super-Saos. Saos-2, derivada de un osteosarcoma humano. Super-Saos es una línea generada en nuestro laboratorio, derivada de la anterior y con alta capacidad de expresar el gen de la esclerostina (SOST)<sup>15</sup>. Ambas líneas fueron cultivadas en frascos T25 con 5 ml de medio de cultivo DMEM (medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco) más 1% P/S (penicilina-estreptomycin) y 1% anfotericina B, y se guardaron en incubadora a 37°C durante una semana, cambiando el medio de cultivo cada 4 días hasta cubrir entre el 60-80% de la superficie del



Correspondencia: Carmen Valero Díaz de Lamadrid (mirvdc@humv.es)

frasco. Las placas se introdujeron en la CH (Galeazzi, Italia; 100% oxígeno; 2,4 atmósferas) durante 90 minutos por sesión recibiendo una, tres o cinco sesiones consecutivas (Figura 1). Se utilizó como grupo control la misma línea celular sometida a idénticas condiciones de cultivo, transporte y manipulación, pero sin someterse a la CH.

### Fragmentos óseos

Se utilizaron fragmentos de hueso trabecular extraídos de la cabeza femoral de pacientes con cirugía de reemplazo de cadera por fractura osteoporótica. Tras la extracción, los fragmentos óseos recibieron una sola sesión de CH (Galeazzi, Italia; 100% oxígeno; 2,4 atmósferas) durante 90 minutos y posteriormente se congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Se utilizaron como controles fragmentos de hueso sometidos a las mismas condiciones de conservación, cultivo, transporte y manipulación pero sin recibir CH. Este experimento fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) de Cantabria. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado.

### Extracción y cuantificación de ARN

A las 24 horas de la última sesión de CH se procedió a la extracción del ARN, tanto en las líneas celulares como en el hueso. En el proceso de homogenización en líneas celulares se realizó lavado de las muestras con tampón fosfato salino (PBS) previo al uso del TRIzol<sup>®</sup>. En el caso de los fragmentos óseos también se empleó TRIzol<sup>®</sup>, así como homogeneización durante 20-30 segundos hasta conseguir pulverizar la muestra, y posteriormente se centrifugó. En ambos casos se siguieron las recomendaciones del fabricante y se continuó con el proceso de separación, precipitación y resuspensión del ARN.

Se usó RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa) cuantitativa para detectar la expresión de los genes: SOST (gen de esclerostina), RUNX2 (proteína relacionada con el factor de transcripción 2), MMP14 (metaloproteína 14), HIF-1 $\alpha$  (factor inducible por hipoxia), SIRT1 (sirtuina1), OPG (osteoprotegerina) y RANKL (ligando del activador del receptor del factor nuclear kappa-B) utilizando ensayos Taqman y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se obtuvieron los valores del ciclo umbral (Ct) y los datos se normalizaron a la expresión de GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y TBP (proteína de unión a caja TATA) utilizando el método  $\Delta\text{Ct}$ . Para calcular el nivel relativo de ARNm se usó la fórmula  $2^{-\Delta\text{Ct}}$ , donde  $\Delta\text{Ct}$  es la diferencia entre la media de los Ct de los genes normalizadores y el Ct del gen de interés.

### Análisis estadístico

Se utilizó test no paramétricos, el test de Wilcoxon para la comparación de medias de dos grupos emparejados. Valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

**Figura 1. Cámara hiperbárica**



## RESULTADOS

### Efecto de CH en la expresión de ARN en la línea celular Saos-2

No hubo diferencias en la expresión de genes en la línea celular tras una, tres o cinco sesiones de CH. Las diferencias respecto al control en  $2^{-\Delta\text{Ct}}$  tras 5 sesiones fueron de 0,71 para SOST ( $p=0,50$ ), 0,89 para SIRT1 ( $p=0,34$ ), 0,47 para MMP14 ( $p=0,18$ ), 0,43 para HIF1 $\alpha$  ( $p=0,18$ ), 0,79 para RUNX2 ( $p=0,65$ ) y 7,91 para OPG ( $p=0,40$ ) (Figura 2). No se detectó expresión de RANKL.

### Efecto de CH en la expresión de ARN en la línea celular Super-Saos

Encontramos con respecto al control que la expresión de OPG disminuye 6 veces tras 5 sesiones de CH ( $2^{-\Delta\text{Ct}}$ , 72  $p=0,01$ ). En el resto de genes no hubo diferencias:  $2^{-\Delta\text{Ct}}$ , de 1,03 para SOST ( $p=0,34$ ), 1,46 para SIRT1 ( $p=0,34$ ), 1,77 para MMP14 ( $p=0,18$ ), 1,08 para HIF1 $\alpha$  ( $p=0,18$ ), 1,14 para RUNX2 ( $p=0,18$ ) y 1,24 para RANKL ( $p=0,31$ ) (Figura 3).

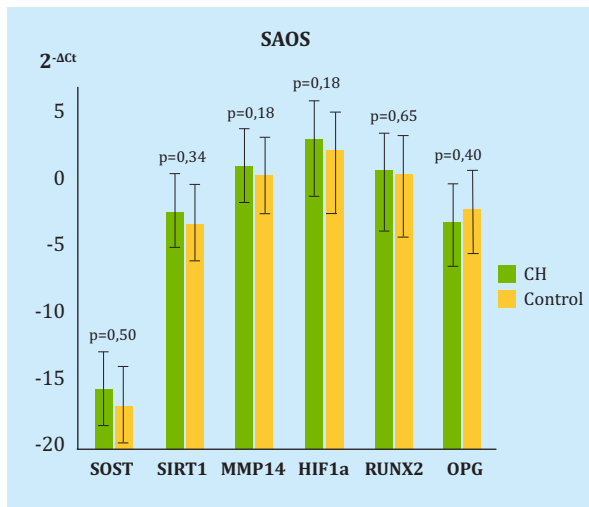
### Efecto de CH en la expresión ARN en hueso trabecular

Tampoco hubo diferencias en la expresión de los genes tras CH en el hueso, solo un modesto incremento, no significativo, en la expresión de SOST con un cambio de  $2^{-\Delta\text{Ct}}$  de 5,39 ( $p=0,48$ ). En el resto de los genes las diferencias fueron de 0,92 para MMP14 ( $p=0,58$ ), 1,28 para HIF1 $\alpha$  ( $p=0,81$ ), 0,72 para RUNX2 ( $p=0,24$ ), 1,18 para SIRT1 ( $p=0,42$ ), 1,97 para RANKL ( $p=0,91$ ) y 3,9 para OPG ( $p=0,55$ ) (Figura 4).

## CONCLUSIONES

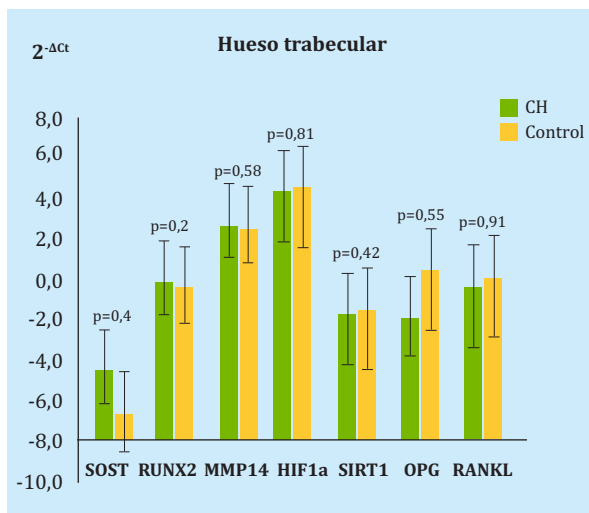
Se cree que la hiperoxia podría ser beneficiosa para el hueso aumentando la proliferación y diferenciación de los osteoblastos<sup>16</sup>. Al Hadi y cols.<sup>6</sup> describieron un aumento en la expresión de colágeno tipo I y ARNm de Runx-2 en líneas celulares de osteoblastos (Saos-2) sometidas a CH durante 14 días (2,4 ATA, 97% O<sub>2</sub>, 90 min/día). La CH aumentó también la proliferación y diferenciación de osteoblastos en hueso alveolar humano<sup>17</sup>. La hiperoxia además parece disminuir la resorción ósea. El tratamiento en CH (100% O<sub>2</sub>,

**Figura 2. Diferencia en la expresión de genes a estudio y los housekeeping en la línea celular SAOS tras 5 sesiones de cámara hiperbárica**



CH: grupo celular sometido a cámara hiperbárica; SOST: esclerostina; SIRT1: sirtuina1; MMP14: metaloproteínasa 14; HIF-1α: factor inducible por hipoxia 1α; RUNX2: proteína relacionada con el factor de transcripción 2; OPG: osteoprotegerina.

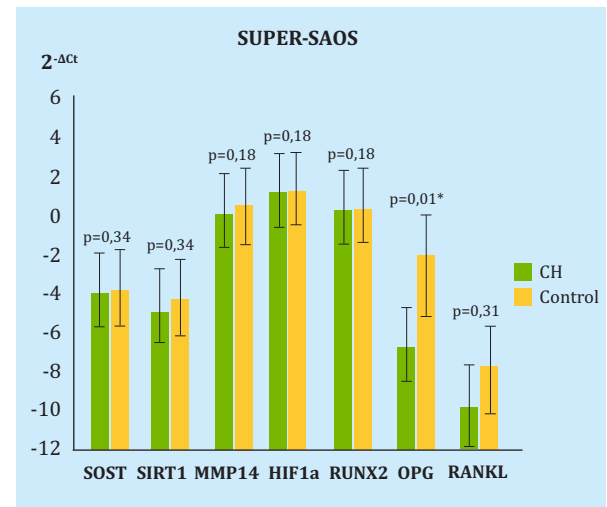
**Figura 4. Diferencia en la expresión de genes a estudio y los housekeeping en hueso tras una única sesión de cámara hiperbárica**



CH: grupo celular sometido a cámara hiperbárica; SOST: esclerostina; SIRT1: sirtuina1; MMP14: metaloproteínasa 14; HIF-1α: factor inducible por hipoxia 1α; RUNX2: proteína relacionada con el factor de transcripción 2; OPG: osteoprotegerina.

2,4 ATA) redujo la expresión de RANK, NFATc1 y Dc-STAMP en el suero de pacientes y reguló también la expresión del factor inducible en hipoxia (HIF-1α)<sup>18</sup>. Otras acciones descritas del oxígeno a alta concentración (O<sub>2</sub> 100%, 2,4 ATA) son la mejora en la angiogénesis, el aumento de la vascularización en aspirado de cresta ilíaca de ratones<sup>19</sup>, mayor proliferación celular<sup>20</sup> o aceleración en la curación de fracturas abiertas de fémur en animales de experimentación<sup>21</sup>. Sin embargo, la mayoría de estos trabajos se han realizado en modelos animales, siendo escasos los estudios en humanos. En pacientes con necrosis avascular de

**Figura 3. Diferencia en la expresión de genes a estudio y los housekeeping en la línea celular Super-SAOS tras 5 sesiones de cámara hiperbárica**



CH: grupo celular sometido a cámara hiperbárica; SOST: esclerostina; SIRT1: sirtuina1; MMP14: metaloproteínasa 14; HIF-1α: factor inducible por hipoxia 1α; RUNX2: proteína relacionada con el factor de transcripción 2; OPG: osteoprotegerina.

la cabeza femoral aumentaron los niveles séricos de OPG tras la CH (5,61±1,99 pmol/L basal, 7,90±1,9 pmol/L tras 15 sesiones, 8,97±2,07 pmol/L tras 30 sesiones; p<0,05), sin producirse cambios en los niveles de RANKL<sup>22</sup>. Tras la CH (2,5 ATA, 100% O<sub>2</sub> durante 90 min/día) mejoró también la diferenciación osteogénica de células mesenquimales de la médula ósea en los pacientes tratados, con una regulación ascendente en Wnt3a, b-catenina y Runx2 y descendente de GSK-3b, en comparación con los aquellos que no la recibieron<sup>12</sup>. Estos mismos autores describieron también un aumento de la proteína morfogenética ósea (BMP2) y de Osterix en los enfermos tratados<sup>12</sup>.

En nuestro estudio no encontramos que el oxígeno a alta concentración en CH influya en la expresión de diferentes genes relacionados con el metabolismo óseo (SOST, SIRT1, MMP14, HIF1α, RUNX2, OPG y RANKL). Sin embargo, queremos destacar que encontramos una ligera tendencia, no significativa, al incremento en la expresión de SOST en el hueso sometido al tratamiento. Sabemos que la tensión de oxígeno influye en la regulación de SOST y que en hipoxia (tensión de oxígeno al 1%) osteoblastos y osteocitos expresan niveles bajos de SOST y esclerostina<sup>23</sup>, quizás esto es debido a una menor expresión de prolil-hidroxilasa (PHD2) ya que se ha visto que la delección de PHD2 en osteocitos origina una menor producción de esclerostina dependiente de SIRT1<sup>14</sup>. Esta vía podría ayudar a comprender mejor el mecanismo fisiopatológico a través del cual, y en sentido contrario, un entorno rico en oxígeno podría aumentar la expresión de SOST y esclerostina. De hecho, nuestro grupo ha encontrado un aumento del 25% en los niveles de esclerostina en el suero de 12 pacientes sometidos al tratamiento en CH. Sin embargo, otros trabajos son contradictorios<sup>13</sup>.

En conclusión, no parece que la hiperoxia en CH influya en la expresión de genes relacionados con el metabolismo óseo, aunque consideramos que se necesitan más estudios que profundicen en el conocimiento de las acciones del oxígeno en el hueso.



**Conflicto de intereses:** Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

## Bibliografía

1. Johnson RW, Sowder ME, Giaccia AJ. Hypoxia and bone metastatic disease. *Curr Osteoporos Rep* [Internet]. 2017;15(4):231-8.
2. Parmar K, Mauch P, Vergilio J-A, Sackstein R, Down JD. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci*. 2007;104(13):5431-6.
3. Kusumbe AP, Ramasamy SK, Adams RH. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. *Nature*. 2014;507(7492):323-8.
4. Arnett TR. Acidosis, hypoxia and bone. *Arch Biochem Biophys*. 2010;503(1):103-9.
5. Utting JC, Flanagan AM, Brandao-Burch A, Orriss IR, Arnett TR. Hypoxia stimulates osteoclast formation from human peripheral blood. *Cell Biochem Funct*. 2010;28(5):374-80.
6. Al Hadi H, Smerdon GR, Fox SW. Hyperbaric oxygen therapy accelerates osteoblast differentiation and promotes bone formation. *J Dent*. 2015;43(3):382-8.
7. Ceponis P, Keilman C, Guerry C, Freiburger JJ. Hyperbaric oxygen therapy and osteonecrosis. *Oral Diseases*. 2017;23(2):141-51.
8. Beth-Tasdogan NH, Mayer B, Hussein H, Zolk O. Interventions for managing medication-related osteonecrosis of the jaw. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;10:CD012432.
9. Eltorai I, Hart GB, Strauss MB. Osteomyelitis in the spinal cord injured: A review and a preliminary report on the use of hyperbaric oxygen therapy. *Paraplegia*. 1984;22(1):17-24.
10. Al Hadi H, Smerdon GR, Fox SW. Hyperbaric oxygen therapy suppresses osteoclast formation and bone resorption. *J Orthop Res*. 2013;31(11):1839-44.
11. Lin S-S, Ueng SW, Niu C-C, Yuan L-J, Yang C-Y, Chen W-J, et al. Effects of hyperbaric oxygen on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *BMC Musculoskelet Disord*. 2014;15(1):56.
12. Lin S-S, Ueng SWN, Niu C-C, Yuan L-J, Yang C-Y, Chen W-J, et al. Hyperbaric oxygen promotes osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells by regulating Wnt3a/ $\beta$ -catenin signaling--an in vitro and in vivo study. *Stem Cell Res*. 2014;12(1):260-74.
13. Fujiwara M, Kubota T, Wang W, Ohata Y, Miura K, Kitaoka T, et al. Successful induction of sclerostin in human-derived fibroblasts by 4 transcription factors and its regulation by parathyroid hormone, hypoxia, and prostaglandin E2. *Bone*. 2016;85:91-8.
14. Stegen S, Stockmans I, Moermans K, Thienpont B, Maxwell PH, Carmeliet P, et al. Osteocytic oxygen sensing controls bone mass through epigenetic regulation of sclerostin. *Nat Commun*. 2018;9(1):2557.
15. Pérez-Campo FM, Sañudo C, Delgado-Calle J, Arozamena J, Zarrabeitia MT, Riancho JA. A sclerostin super-producer cell line derived from the human cell line SaOS-2: a new tool for the study of the molecular mechanisms driving sclerostin expression. *Calcif Tissue Int*. 2014;95(2):194-9.
16. Chang H, Oh S-E, Oh S, Hu K-S, Kim S. Four-week histologic evaluation of grafted calvarial defects with adjunctive hyperbaric oxygen therapy in rats. *J Periodontal Implant Sci*. 2016;46(4):244-53.
17. Wu D, Malda J, Crawford R, Xiao Y. Effects of hyperbaric oxygen on proliferation and differentiation of osteoblasts from human alveolar bone. *Connect Tissue Res*. 2007;48(4):206-13.
18. Hadi H Al, Smerdon G, Fox SW. Osteoclastic resorptive capacity is suppressed in patients receiving hyperbaric oxygen therapy. *Acta Orthop*. 2015;86(2):264-9.
19. Grassmann JP, Schnependahl J, Sager M, Hakimi AR, Herten M, Loegters TT, et al. The effect of bone marrow concentrate and hyperbaric oxygen therapy on bone repair. *J Mater Sci Mater Med*. 2015;26(1):5331.
20. Sunkari VG, Lind F, Botusan IR, Kashif A, Liu Z-J, Ylä-Herttua S, et al. Hyperbaric oxygen therapy activates hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1), which contributes to improved wound healing in diabetic mice. *Wound Repair Regen*. 2015;23(1):98-103.
21. Kawada S, Wada E, Matsuda R, Ishii N. Hyperbaric hyperoxia accelerates fracture healing in mice. *PLoS One*. 2013;8(8):e72603.
22. Vezzani G, Quartesan S, Cancellara P, Camporesi E, Mangar D, Bernasek T, et al. Hyperbaric oxygen therapy modulates serum OPG/RANKL in femoral head necrosis patients. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2017;32(1):707-11.
23. Genetos DC, Toupadakis CA, Raheja LF, Wong A, Papanicolaou SE, Fyhrie DP, et al. Hypoxia decreases sclerostin expression and increases Wnt signaling in osteoblasts. *J Cell Biochem*. 2010;110(2):457-67.