

UCH-FC
Mag-B
A859
c.1



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**EFFECTO DIFERENCIAL DE LEPTINA SOBRE PPAR γ Y MARCADORES DE
DIFERENCIACIÓN ADIPOGÉNICA, EN CÉLULAS TRONCALES
MESENQUIMÁTICAS (MSC) HUMANAS DE DONANTES SANAS Y
OSTEOPORÓTICAS**

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

En cumplimiento parcial de los requisitos

Para optar al grado de

Magister en Ciencias Biológicas

Facultad de Ciencias

por

Pablo Andrés Astudillo Besnier

Octubre, 2008

Santiago, Chile

Director de Tesis: Dr. Juan Pablo Rodríguez Vives

Profesor Patrocinante: Dr. Marco A. Méndez





FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias presentada por el candidato.

Pablo Andrés Astudillo Besnier

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 07 del mes de Agosto de año 2008 (fecha del examen privado).

Director de Tesis

Dr. Juan Pablo Rodríguez Vives

Profesor Patrocinante

Dr. Marco A. Méndez

.....

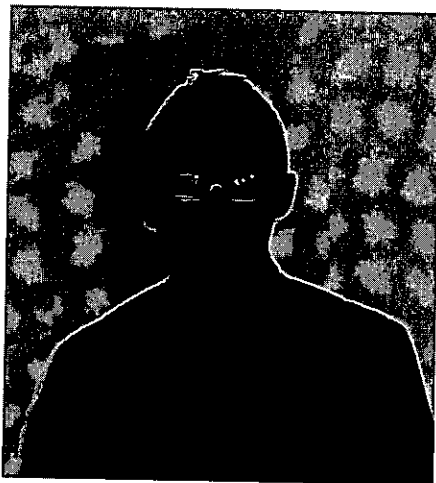
Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Cecilia Rojas

Dr. Jorge Martínez



BIOGRAFIA



Mi nombre es Pablo Andrés Astudillo Besnier. Nací el 11 de septiembre de 1980, en la ciudad de Rancagua, y viví en Peumo, pequeña ciudad en el valle del Cachapoal, hasta los 18 años. Estudié en el Colegio El Salvador, en San Vicente de Tagua Tagua, en donde aprendí a amar las Ciencias Naturales. Al salir del colegio, ingresé a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, en donde cursé la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular, y en donde conocí a grandes personas, que hasta hoy se han convertido en mis mejores amigos.

AGRADECIMIENTOS



Hay muchas personas que me ayudaron en este camino, desde el día en que pisé por primera vez la Facultad de Ciencias. En primer lugar, quiero agradecer a todas las personas que siempre estuvieron presentes durante el desarrollo de mi tesis: el Dr. Juan Pablo Rodríguez, mi tutor, quien muchas veces me trajo a tierra firme cuando estaba en las nubes; a Susana Ríos, a todos los académicos del Laboratorio de Biología Celular del INTA y mis compañeros de laboratorio, que me ayudaron, enseñaron e incluso me cooperaron en algunos experimentos. Agradezco especialmente a la Dra. Ana María Pino y al Dr. Marco Mendez, por su apoyo en el análisis estadístico y su patrocinio para la realización de mi tesis en el INTA.

Muchas personas también me acompañaron también durante estos años. Quiero agradecer a todos los amigos y compañeros de estudio. También quiero agradecer a todos aquellos académicos de la Facultad que tuvieron el valor de ser más que un docente, a quienes se atrevieron a ser guías y consejeros.

Quiero agradecer también a mi novia, Paola, quien ilumina cada uno de mis días desde que tuve la fortuna de conocerla. Para ti, gracias por la compañía, el apoyo y tu amor. Me haces infinitamente feliz.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia, y en especial a mis padres, por darme la alegría de vivir y de querer seguir adelante.



INDICE DE MATERIAS

INTRODUCCION	1
1. La Osteoporosis como un problema de salud pública	1
1.1. Metabolismo óseo normal	3
1.2. Regulación del metabolismo óseo	5
2. Células Troncales Mesenquimáticas	6
2.1. Osteogénesis y MSCs	8
2.2. Adipogénesis y MSCs	9
3. Patogénesis de la Osteoporosis	12
3.1. Mecanismos putativos de la protección mediada por el sobrepeso frente a la osteoporosis: Leptina.	13
3.2. Relación entre PPAR γ , Runx2 y el envejecimiento	15
HIPOTESIS DE TRABAJO	17
OBJETIVOS GENERALES Y ESPECIFICOS	17
1. Objetivo General	17
2. Objetivos Específicos	17
MATERIALES Y METODOS	19
1. Selección de las pacientes donantes y obtención de MSCs	19
2. Obtención y Purificación de MSCs	20
3. Expansión de MSCs <i>in vitro</i>	21
4. Criopreservación de MSCs	21
5. Diferenciación Adipogénica de MSCs	22
6. Inmunofluorescencia de MSCs	22
7. Lisis Celular	23

8.	Western Blot	24
9.	Determinación de leptina (Ob) y receptor soluble de leptina (Ob-sR) en plasma de médula ósea y sangre periférica	25
10.	Extracción de RNA y RT-PCR	26
11.	Análisis Estadístico	28
	RESULTADOS	30
1.	Establecimiento de cultivos de MSCs de donantes sanas y osteoporóticas	30
2.	Diferenciación Adipogénica de MSCs	31
2.1.	Determinación de la diferenciación adipogénica de MSCs	31
2.2.	Expresión y localización de PPAR γ en C-MSCs y O-MSCs cultivadas en condiciones adipogénicas, visualizada mediante inmunofluorescencia.	32
2.3.	Análisis de la expresión de PPAR γ durante la adipogénesis, mediante Western Blot	34
2.4.	Efecto de leptina sobre la expresión de PPAR γ durante la adipogénesis, evaluado mediante Western Blot	36
2.5.	Análisis de la fosforilación de PPAR γ durante la adipogénesis, mediante Western Blot	38
2.6.	Efecto de leptina sobre la fosforilación de PPAR γ durante la adipogénesis, mediante Western Blot	40
2.7.	Expresión de marcadores de diferenciación adipogénica de MSCs	42
3.	Expresión y biodisponibilidad de leptina	45
3.1.	Niveles plasmáticos de leptina (Ob) y de su receptor soluble (Ob-sR)	45





	en plasma de médula ósea y de sangre periférica	
3.2.	Abundancia relativa del gen <i>ob</i> en MSCs de donantes sanas y osteoporóticas.	47
	DISCUSION	49
1.	Respuesta frente al estímulo adipogénico de las MSC	49
2.	Expresión de la proteína PPAR γ y cambios en su nivel de fosforilación	52
3.	Efecto de leptina sobre PPAR γ	55
4.	Disponibilidad de leptina en la médula ósea	59
5.	Propuesta de un modelo de regulación de leptina sobre la adipogénesis	62
	CONCLUSIONES	68
	BIBLIOGRAFIA	69

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Partidores utilizados para la amplificación por PCR.	29
Tabla 2.	Características de las donantes analizadas	47
Tabla 3.	Resumen de características diferenciales entre las donantes sanas y osteoporóticas, o entre las MSCs obtenidas desde cada tipo de donante.	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Hueso normal y osteoporótico	2
Figura 2.	Remodelamiento óseo	4
Figura 3.	Factores que afectan el metabolismo óseo	5
Figura 4.	Plasticidad de las MSCs	7
Figura 5.	MSCs en cultivo	30
Figura 6.	Diferenciación adipogénica de MSCs.	31
Figura 7.	Inmunofluorescencia para PPAR γ en MSCs.	33
Figura 8.	Depósitos de grasa en O-MSCs positivas para PPAR γ	34
Figura 9.	Expresión de PPAR γ en MSCs, evaluada mediante Western Blot.	35
Figura 10.	Efecto de leptina sobre la expresión de PPAR γ en MSCs, evaluada mediante Western Blot..	37
Figura 11.	Fosforilación de PPAR γ (p-PPAR γ) en MSCs, evaluada mediante Western Blot.	39
Figura 12.	Efecto de leptina sobre la abundancia de PPAR γ fosforilado.	41
Figura 13.	Razón p-PPAR γ /PPAR γ total en MSCs	42

Figura 14.	Expresión de marcadores adipogénicos en las MSCs, evaluado mediante RT-PCR	44
Figura 15.	Abundancia de leptina y su receptor soluble en el plasma	46
Figura 16.	Abundancia relativa del gen <i>ob</i> (<i>leptina</i>)	48
Figura 17.	Regulación de la adipogénesis en C-MSCs	65
Figura 18.	Regulación de la adipogénesis en O-MSCs	66

LISTA DE ABREVIATURAS

ALP	Fosfatasa Alcalina
DMO	Densidad Mineral Ósea
BMPs	Proteínas morfogenéticas del hueso
BSA	Albúmina de suero bovino
BSP	Bone Sialoprotein
Cbfa1	Core binding factor 1
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
C/EBP	CCAAG Enhancer Binding Protein
CO ₂	Dióxido de Carbono
COL	Colágeno
DEPC	Dietil Pirocarbonato
DEXA	Absorciometría de doble energía radiológica
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMEM-SF	Medio DMEM suplementado con 10% Suero Fetal Bovino
DMO	Densidad Mineral Ósea
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico

dNTP	2'-deoxinucleósido 5'-trifosfato
ECL	Reacción de quimioluminiscencia
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERK	Extracellular Related Kinase
GPDH	Glucosa Fosfato Deshidrogenasa
HCl	Ácido Clorhídrico
IBMX	Isobutil-metil-xantina
IMC	Índice de Masa Corporal
MA	Medio Adipogénico
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MO	Medio Osteogénico
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MSC	Células troncales (estromal) mesenquimáticas
NaOH	Hidróxido de Sodio
OC	Osteocalcina
OSX	Osterix
PAGE	Electroforesis en geles de acrilamida
PBS	Tampón fosfato salino
PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
RNA	Ácido Ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reverse Transcripte Polymerase Chain Reaction
Runx2	Runt-related transcription factor 2
SDS	Dodecilsulfato de Sodio

SF	Suero fetal bovino
TBS	Tampón tris salino
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta

RESUMEN

La osteoporosis es una enfermedad en que se produce un deterioro en la arquitectura y calidad del hueso, que afecta a un tercio de la población femenina postmenopáusica y a un quinto de la población masculina. Si bien no se han dilucidado los mecanismos que influyen en el establecimiento de esta enfermedad, ésta se caracteriza por un aumento en la degradación del hueso y una disminución en su formación. Además, se observa un aumento en el número de adipocitos en la médula ósea, junto con una disminución en el número de osteoblastos.

En la médula ósea se encuentran presentes Células Troncales Mesenquimáticas (MSC), que pueden diferenciarse para formar osteoblastos y adipocitos, entre otros tipos celulares, mediante la expresión de factores de transcripción específicos: Runx2, durante la diferenciación osteogénica, y PPAR γ , durante la diferenciación adipogénica.

PPAR γ es un factor de transcripción esencial para la diferenciación adipogénica, y su actividad es regulada negativamente mediante fosforilación. Si bien esta proteína ha sido extensivamente estudiada, se sabe poco acerca de su perfil de expresión y fosforilación durante la diferenciación de MSCs humanas postmenopáusicas.

Debido a la plasticidad de las MSCs, se ha propuesto que la osteoporosis se produciría por una disminución en el número de osteoblastos asociado a un aumento en la formación de adipocitos en la médula ósea de pacientes osteoporóticas ("teoría lipídica de la osteoporosis). De manera interesante, se ha observado que el sobrepeso ejerce un efecto protector contra la osteoporosis, proponiéndose que leptina, hormona secretada principalmente por los adipocitos, podría mediar este efecto.

En esta Tesis, se estudió el perfil de expresión y fosforilación de PPAR γ durante el proceso de diferenciación adipogénica, en MSCs obtenidas desde la médula ósea de mujeres postmenopáusicas sanas y osteoporóticas, y el efecto que leptina ejerce sobre este factor de transcripción. Además, se estudió el nivel de leptina circulante en la médula ósea de mujeres postmenopáusicas sanas y osteoporóticas.

Los resultados muestran que las MSCs de donantes osteoporóticas (O-MS) expresan mayores niveles de PPAR γ , en comparación con las de donantes sanas (C-MS). La forma fosforilada de PPAR γ disminuye durante la diferenciación adipogénica, sólo en las C-MS, sugiriendo activación. Leptina ejerce efectos negativos sobre PPAR γ en las C-MS, disminuyendo sus niveles y manteniendo su nivel de fosforilación en un nivel similar al observado en condiciones basales. Además, se observa una mayor concentración de leptina en la médula ósea de donantes sanas.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que existe un comportamiento diferencial de PPAR γ en ambos tipos de donantes. Las MSCs de donantes osteoporóticas expresan altos niveles de este factor de transcripción, lo que puede contribuir al aumento de la capacidad de diferenciación adipogénica observado en estas células. Además, la mayor disponibilidad de leptina en la médula ósea de donantes sanas, junto a la regulación negativa de leptina sobre la adipogénesis en las C-MS, puede contribuir a favorecer un recambio óseo que permita la mantención de una adecuada estructura y funcionalidad del hueso.

ABSTRACT

The osteoporosis is a disease characterized by a loss of bone quality and architecture, affecting thirty-three percent of the postmenopausal female population and twenty percent of the male population. Although the mechanisms involved in the establishment of this disease are not well understood, it is characterized by an increase in bone resorption together with a decrease in bone formation. Also, it has been observed an increase in the number of adipocytes in the bone marrow, associated with a decrease in the number of osteoblasts.

Mesenchymal stem cells (MSC) are present in the bone marrow, and they can differentiate into osteoblasts and adipocytes, among other cell phenotypes, through the action of specific transcription factors: Runx2, for the osteogenic differentiation, and PPAR γ , for the adipogenic differentiation.

PPAR γ is a transcription factor essential for adipogenic differentiation. Its activity is negatively regulated by phosphorylation. Although this protein has been extensively studied, little is known about its expression and phosphorylation pattern during the differentiation of human postmenopausal MSCs.

Due to the plasticity of MSCs, it has been proposed that the pathogenesis of this disease could be explained by a decrease in the number of osteoblasts, associated with an increase in the formation of adipocytes in the bone marrow of osteoporotic patients (lipid theory of osteoporosis). Interestingly, it has been observed that overweight exerts a protective effect against osteoporosis, and it has been proposed that leptin, hormone secreted mainly by adipocytes, could mediate this effect.

In the present work, we studied the expression and phosphorylation pattern of PPAR γ during adipogenesis, in MSCs isolated from bone marrow of healthy and osteoporotic postmenopausal women, and the effect of leptin on this transcription factor. In addition, we studied the leptin levels in the bone marrow of postmenopausal female, healthy and osteoporotic, donors.

The results show that MSCs from osteoporotic donors (O-MSK) express higher levels of PPAR γ compared with MSCs derived from healthy donors (C-MSK). The phosphorylated form of PPAR γ decreases during the adipogenic differentiation only in C-MSK, suggesting the activation of this transcription factor. Leptin produces a negative effect on PPAR γ in C-MSKs, decreasing the expression and increasing the phosphorylation of this transcription factor. In addition, it is observed a higher concentration of leptin in the bone marrow of healthy donors.

The results presented in this work suggest that there is a differential behavior of PPAR γ in both types of donors. MSCs from osteoporotic donors express high levels of this transcription factor, which may contribute to the increased adipogenic differentiation observed in these cells. In addition, the antiadipogenic effect that leptin exerts in the C-MSKs, together with the high concentration of this hormone in the bone marrow of healthy donors, support the hypothesis of the protective effect of overweight on osteoporosis.

INTRODUCCION

1. La Osteoporosis como un problema de salud pública

La osteoporosis es una enfermedad asociada principalmente al envejecimiento, y que se caracteriza por una pérdida de masa ósea, lo que provoca fragilidad del hueso y, por ende, un incremento en el riesgo de fracturas especialmente de vértebras y de cadera (Figura 1). Esta enfermedad es uno de los problemas de salud pública de mayor impacto mundial, ya que afecta a aproximadamente 200 millones de personas en el mundo, principalmente a mujeres postmenopáusicas (Lin y Lane, 2004), e implica grandes costos para las entidades de salud (Morales-Torres y Gutiérrez-Ureña, 2004).

La incidencia de esta enfermedad es variable dependiendo de la dieta y la actividad física de la población estudiada. Según las estadísticas de la IOF ("International Osteoporosis Foundation"), el 34% de las mujeres postmenopáusicas padecen esta enfermedad, aunque se presenta también en el 20% de la población masculina (www.osteofound.org). Un estudio realizado recientemente en Chile mostró que un 29,7% de las mujeres entre 55 y 84 años presentaba al menos una fractura vertebral (Rodríguez y col. 2007). Además, se diagnosticó osteoporosis densitométrica en el 35% de las mujeres estudiadas, y la frecuencia de osteoporosis de columna lumbar observada se duplicó entre los 55 y los 70 años, mientras que la frecuencia de osteoporosis de cadera aumentó hasta un 53,3% entre los 80 y 85 años de edad. Este último dato adquiere importancia si se considera que la mortalidad por efecto de las fracturas producidas por la fragilidad ósea es significativa, pudiendo alcanzar hasta un 20% después de un año tras una fractura de cadera (American College of Obstetricians and Gynecologists, 2004).

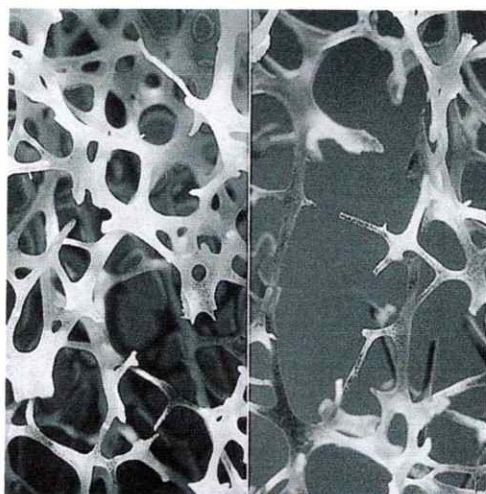


Figura 1. Hueso normal y osteoporótico. Hueso trabecular normal (izquierda) versus hueso trabecular osteoporótico (derecha), donde se observa las placas trabeculares convertidas en perforaciones (fuente: International Osteoporosis Foundation).

Actualmente, se considera que la osteoporosis representa un proceso continuo, en que múltiples mecanismos convergen para producir una pérdida de masa ósea y un deterioro de la microarquitectura de la estructura esquelética. Estos factores, asociados a un incremento en el riesgo de caídas, contribuyen a una alta incidencia de fracturas en las pacientes osteoporóticas

De acuerdo a su origen, la osteoporosis se puede clasificar en primaria y secundaria. La primaria se subdivide en tipo I u “osteoporosis postmenopáusica”, relacionada con la disminución en los niveles de estrógenos después de la menopausia (Compston, 2002), y tipo II u “osteoporosis senil”, relacionada con trastornos metabólicos que ocurren durante el envejecimiento, como una disminución en la ingesta de calcio, deficiencia de vitamina D y una absorción intestinal anormal, que pueden influir en el desarrollo de hiperparatiroidismo secundario, el cual favorece la osteoporosis. La osteoporosis secundaria se produce, entre otras causas, por desórdenes endocrinos, renales y nutricionales.

1.1. Metabolismo óseo normal

El tejido óseo se encuentra en constante recambio. En condiciones normales, el proceso de formación ósea se encuentra en equilibrio con la degradación o resorción del hueso. La pérdida de hueso durante el envejecimiento ocurre debido a que la resorción del hueso excede a su formación en los lugares donde se desarrolla el proceso de remodelación. Este "desacoplamiento" comienza a manifestarse a partir de los 35 años, y es especialmente importante después de la menopausia, estimándose entre un 50-75% el incremento en la resorción ósea en este período.

El proceso de remodelamiento óseo comienza con la *activación* de los osteoclastos, células encargadas de la resorción ósea, que se inicia mediante la interacción de células precursoras hematopoyéticas con células osteoblásticas, las cuales son encargadas de la formación del tejido óseo (Raisz, 2005). Una vez que ha ocurrido la activación de los osteoclastos, comienza la fase de *resorción*, luego de lo cual ocurre una breve fase de *transformación* en que la superficie del hueso es cubierta por células mononucleares. Esto da inicio a la fase de *formación* ósea, que involucra el depósito de componentes de matriz extracelular por los osteoblastos (Figura 2).

Debido al desequilibrio observado entre los procesos de formación y resorción ósea en la osteoporosis, se ha propuesto que una excesiva osteoclastogénesis, junto con una disminución en la formación de tejido óseo es responsable de la alteración de este equilibrio (Manolagas y Jilka, 1995). No obstante, observaciones histomorfométricas realizadas en pacientes osteoporóticas sugieren que este desbalance también se puede producir por el reemplazo de la población de células óseas funcionales por tejido adiposo (Ebeling y col. 1996; Nuttall y col. 1998).

Estudios posteriores han demostrado que el aumento del tejido adiposo observado en la médula ósea de estos pacientes ocurre a expensas de una

disminución del número de células del linaje osteogénico (Nuttall y Gimble, 2000). Estos y otros estudios sugieren una relación inversa entre los adipocitos y los osteoblastos en la médula ósea, aunque la información relativa a esta relación en pacientes normales u osteoporóticos, es más bien escasa. Por ende, poco se sabe acerca de las bases moleculares de la patogénesis de la osteoporosis primaria.

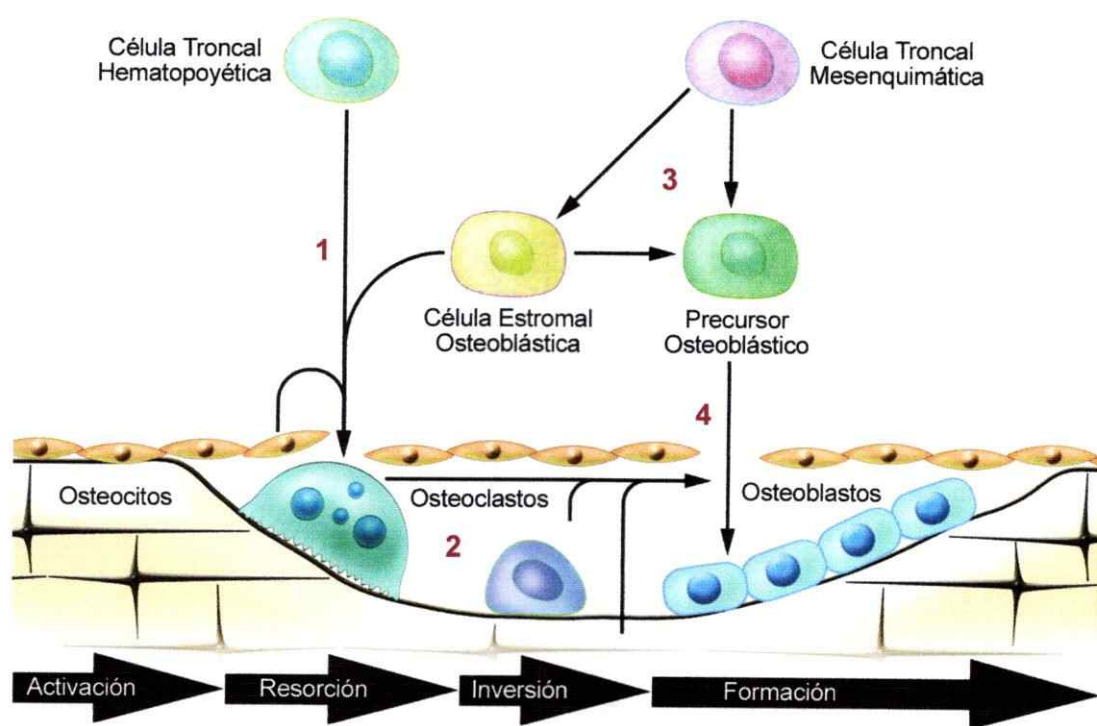


Figura 2. Remodelamiento óseo. El remodelamiento ocurre por la acción de células específicas; es necesaria la activación de osteoclastos, encargados de la resorción ósea, mediante la interacción de su precursor, la célula troncal hematopoyética, con células estromales osteoblásticas. Luego de la resorción, ocurre una breve etapa de inversión o transformación que conduce a la posterior formación del tejido óseo mediante la acción de los osteoblastos. Los números señalados en rojo indican el orden en que los procesos ocurren en la médula ósea (modificado de Raisz, 2005).

1.2. Regulación del metabolismo óseo

En condiciones normales, el metabolismo óseo se encuentra regulado por una serie de factores. Entre ellos, se encuentran factores de crecimiento, tales como TGF- β , IGF-I y II, FGF, IL-1 e IL-6; las hormonas PTH y GH; estrógenos, vitamina D y efectos mecánicos, algunos de los cuales se pueden encontrar desbalanceados en la osteoporosis (Figura 3).

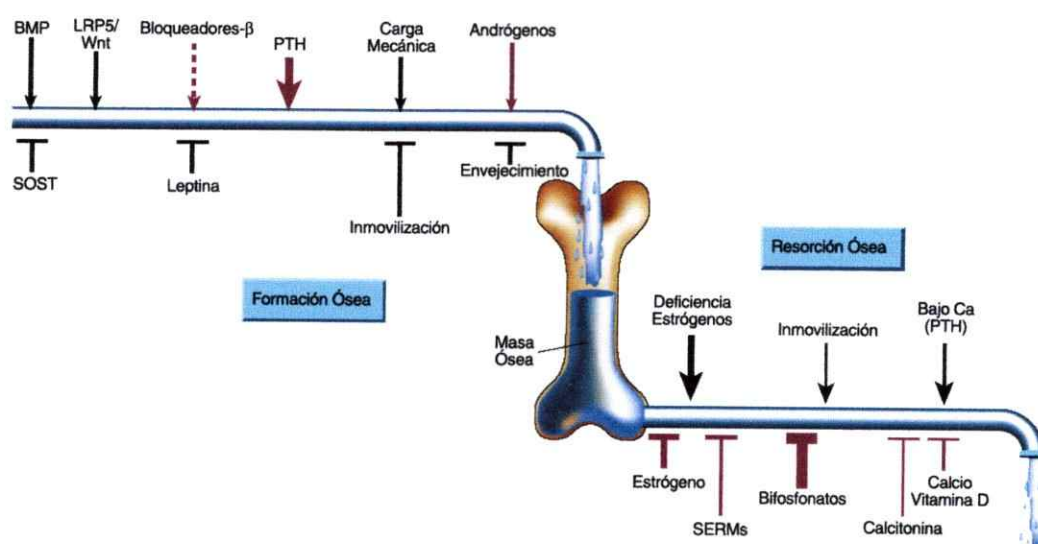


Figura 3. Factores que afectan el metabolismo óseo. Existen diversos estimuladores e inhibidores fisiológicos del proceso de formación y resorción ósea (indicados con flechas negras en la figura). Además, existen estimuladores e inhibidores de origen farmacológico (indicados con flechas rojas). SOST, sclerostin; LRP5, low density lipoprotein receptor related protein 5; PTH, parathyroid hormone; SERM, selective oestrogen-receptor modulator (modificado de Harada y col. 2003).

No obstante los constantes avances en el estudio de la osteoporosis, no se ha desarrollado un tratamiento efectivo para combatir esta enfermedad. Los tratamientos actuales han sido dirigidos a evitar la resorción ósea mediante el uso de agentes antiresorptivos como los bifosfonatos (Epstein y Zaidi, 2005), entre los que destacan el *Risendronato* (Borah y col. 2005, Mellström y col. 2004) y el *Ibandronato* (Chesnut III y

col. 2004; Reginster y col. 2006), los que se unen a la superficie del hueso e inactivan a los osteoclastos, induciendo su muerte celular programada. Otro fármaco de uso reciente es el *Teriparatide*, que estimula la formación ósea (Neer y col. 2001), y corresponde a un polipéptido de origen recombinante, que contiene los primeros 34 aminoácidos de la región N-terminal de la hormona paratiroidea (por lo que es conocido también como "rh[1-34]PTH"). Sin embargo, este fármaco lleva pocos años en el mercado, por lo que no se ha comprobado su efectividad a largo plazo.

2. Células Troncales Mesenquimáticas

Los osteoblastos y adipocitos se originan a partir de un precursor común: la *célula troncal mesenquimática* (MSC). Las MSCs, denominadas también *células estromales mesenquimáticas* o *células progenitoras mesenquimáticas multipotentes*, se encuentran presente en la médula ósea y son capaces de diferenciarse y dar origen a osteoblastos, mediante la acción de los factores de transcripción esenciales de la osteogénesis como Runx2 y Osx, y a adipocitos, mediante la acción de los factores de transcripción PPAR γ y C/EBP α , entre otros (Figura 4).

Además, las MSCs pueden diferenciarse en condrocitos, mioblastos, células neuronales y pancreáticas, entre otros fenotipos, dependiendo de la acción de diversos factores de transcripción específicos para cada linaje.

Surge, por lo tanto, una pregunta: ¿Existe en la osteoporosis una mayor probabilidad de que las MSCs presenten una capacidad disminuida de diferenciación hacia el linaje osteogénico? Se ha demostrado que preadipocitos humanos pueden transdiferenciarse a osteoblastos *in vivo* (Justesen y col. 2004; Schilling y col. 2007), y que MSCs comprometidas hacia la vía osteoblastogénica pueden transdiferenciarse y formar adipocitos (Song y Tuan, 2004; Schilling y col. 2007). Además, se ha

profundizado en la relación entre adipocitos y osteoblastos y su efecto en el metabolismo óseo, aunque casi exclusivamente en investigaciones enfocadas en el estudio de la vía Wnt (Kawai y col. 2007; Zhou y col. 2007; Schilling y col. 2007; Kang y col. 2007; Takada y col. 2007b). En este sentido, se ha propuesto muy recientemente un modelo por el cual la inactivación de PPAR γ podría influir en la decisión de una célula troncal de comprometerse hacia el linaje osteogénico, mediado por la vía no canónica de Wnt (Takada y col. 2007a; Takada y col. 2007b).

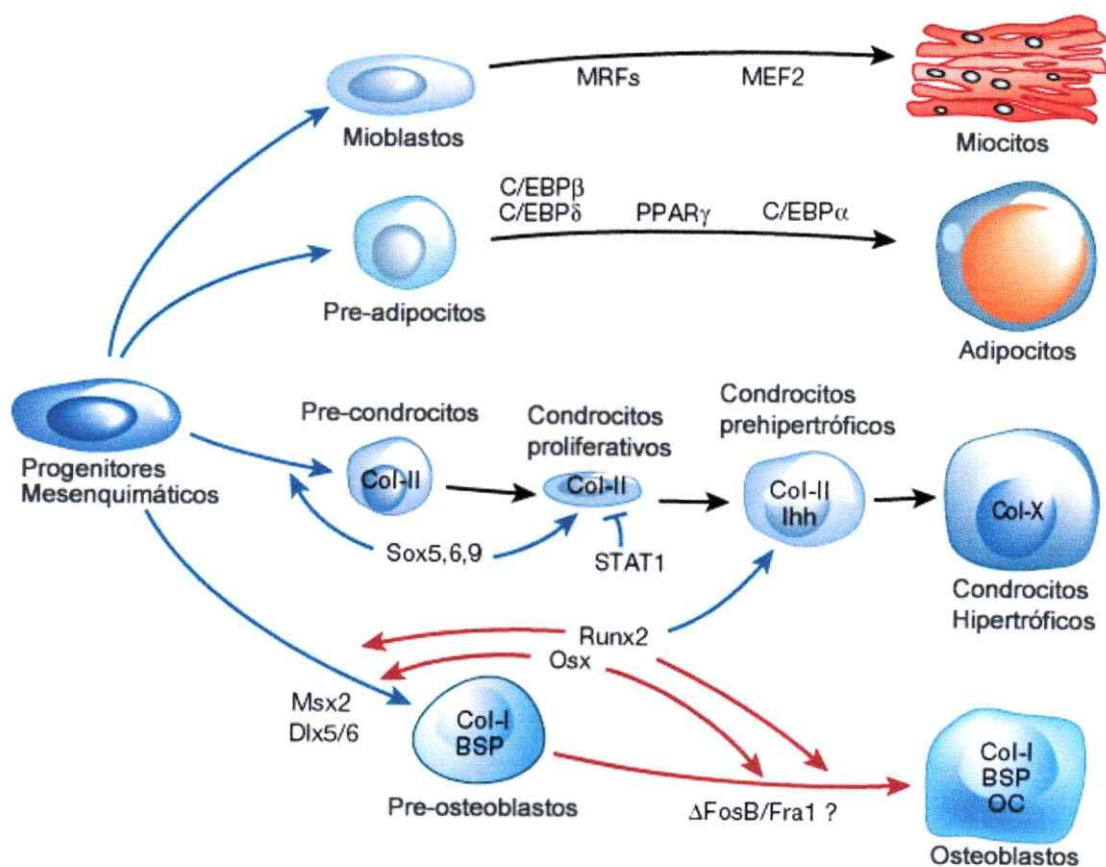


Figura 4. Plasticidad de las MSCs. Las MSCs pueden diferenciarse a distintos linajes celulares, dependiendo de la expresión de factores de transcripción específicos. MRFs, myogenic regulatory factors; MEF2, myocyte-enhancer factor 2; STAT1, Signal transducers and activators of transcription-1; Ihh, Indian Hedgehog; otras abreviaturas, léase Tabla de abreviaturas (modificado de Harada y col. 2003).

Sin embargo, es probable que un mecanismo de regulación de la actividad de PPAR γ mediada por esta vía sea responsable sólo en parte del compromiso de una MSC hacia el linaje osteogénico (Günther y Schüle, 2007). Además, queda por resolver si efectivamente éste y otros posibles mecanismos se encuentran funcionalmente activos en células troncales de pacientes osteoporóticas.

Además de lo anteriormente expuesto, es importante señalar que, hasta la fecha, no se ha descrito que exista una vía de diferenciación preferente en las MSCs osteoporóticas hacia un linaje determinado. Observaciones de nuestro grupo de trabajo sugieren que, efectivamente, las MSC de donantes osteoporóticas presentan una mayor capacidad de diferenciación adipogénica (Rodríguez y col. 2000).

2.1. Osteogénesis y MSCs.

El proceso de diferenciación de MSCs hacia osteoblastos es regulado por factores de transcripción específicos. El más estudiado de estos factores es Runx2 (que también se conoce como Cbfa1, Osf2, AML3 y PEBP2 α A, siendo los dos primeros los nombres más usados en la literatura), el cual tiene un rol fundamental en la osteogénesis. Se ha observado que ratones *knock-out* para Runx2 no presentan tejido óseo y sólo forman cartílago (Komori y col. 1997, Otto y col. 1997). La expresión de Runx2 está restringida a tejidos óseos (Ducy y col. 1997) y su sobreexpresión puede causar osteopenia *in vivo* (Liu y col. 2001; Geoffroy y col. 2002). Además, se ha observado que la incorporación de Runx2 en células no relacionadas con el linaje osteogénico induce la diferenciación osteoblástica (Nishimura y col. 2002; Zheng y col. 2004; Zhao y col. 2005), o bien la expresión de marcadores osteogénicos.

Runx2 es regulado mediante el uso de promotores alternativos, generándose dos isoformas (Runx-I y Runx-II) de igual capacidad transcripcional, y por su estado de

fosforilación. Runx2 presenta un dominio llamado PST, rico en serinas y treoninas, que es fosforilado por distintas quinasas, y es esencial para su actividad (Xiao y col. 2000). Al respecto, los datos reportados en la literatura son contradictorios, puesto que se ha reportado la inhibición de la actividad transcripcional de Runx2 en el estado fosforilado (Wee y col. 2002), mientras que otros autores han demostrado que la fosforilación es necesaria para que la proteína sea activa (Xiao y col. 2000; Xiao y col. 2002, Shui y col. 2003; para una revisión general sobre las vías de transducción de señales y Runx2, refiérase a Franceschi y Xiao, 2003).

Otro factor de transcripción que coopera junto a Runx2 en la diferenciación osteogénica es Osx (Nakashima y col. 2002), el cual se encuentra río abajo, respecto a Runx2, en la vía de diferenciación (Nakashima y col. 2002; Celil y col. 2005). Se ha sugerido que la interacción de Runx2, Osx y otras proteínas, formando complejos transcripcionales, serían responsables del compromiso y la diferenciación de una célula pluripotente hacia el linaje osteogénico (Komori, 2006). Además, diversas proteínas pueden influir en el proceso de diferenciación osteogénica, siendo una de ellas la proteína BMP-2, miembro de la familia de las TGF- β (Canalis y col. 2003; Miyazono y col. 2004).

2.2. Adipogénesis y MSCs.

De manera similar a la osteogénesis, el proceso de diferenciación adipogénica ocurre por la acción conjunta de un grupo de factores de transcripción, que inducen la expresión de genes específicos mediante elementos de respuesta insertos en sus regiones promotoras. Entre estos factores de transcripción, el mejor caracterizado es PPAR γ , el cual es esencial para la formación de tejido adiposo *in vivo* (Rosen y col. 1999; Barak y col. 1999). Esto ha sido confirmado mediante la generación de ratones

quiméricos que son haploinsuficientes para PPAR γ (PPAR γ +/-), los cuales no presentan tejido adiposo. PPAR γ es, además, esencial para la diferenciación adipogénica *in vitro*. Así, la transfección de células que no expresan *ppary* con una forma constitutivamente activa de la proteína induce la diferenciación a adipocitos. Por el contrario, la expresión de una forma dominante negativa de PPAR γ impide la diferenciación hacia adipocitos. Los antecedentes señalados demuestran que PPAR γ es necesario (y suficiente en varios modelos de estudio) para la adipogénesis (como es revisado por Lowell, 1999; Kota y col. 2005; Rangwala y col. 2000, Lee y col. 2003).

PPAR γ ejerce su actividad transcripcional formando un heterodímero con la proteína RXR (Retinoid X Receptor), cofactor que estabiliza a PPAR γ impidiendo su degradación. Además, PPAR γ se activa en respuesta al estímulo de ciertos ligandos químicos, como *rosiglitazona* y *tiazolidinediona*. El tratamiento de células con estos ligandos induce la diferenciación adipogénica, confirmando el rol de PPAR γ en este proceso. Por otra parte, diversos estudios sugieren que PPAR γ se inactiva cuando se fosforila en el residuo serina 112 (Hu y col. 1996; Adams y col. 1997; Diradourian y col. 2005). Esto sugiere que la fosforilación de PPAR γ sería un mecanismo de regulación importante de su actividad transcripcional.

Al mismo tiempo, existe un fenómeno de regulación transcripcional mediante el uso alternativo de promotores, que pueden originar al menos dos isoformas de la proteína, PPAR γ 1 y PPAR γ 2. Si bien no se han reportado diferencias en cuanto a la actividad transcripcional entre ambas isoformas, PPAR γ 2 es la isoforma más estudiada, y se ha demostrado, en líneas celulares, que es la isoforma cuya expresión aumenta durante la diferenciación adipogénica (Saladin y col. 1999), mientras que PPAR γ 1 presenta una expresión más bien constitutiva. El residuo Ser112, presente en

la isoforma PPAR γ 2, equivale al residuo Ser84 en PPAR γ 1, por lo que la regulación post-traducciona mediante fosforilación ocurre en ambas isoformas.

PPAR γ actúa en conjunto con otros factores de transcripción durante la diferenciación adipogénica (Tang y col. 2004), especialmente con miembros de la familia de las C/EBPs (CCAAT Enhancer Binding Proteins, revisadas por Ramji y Foka, 2002). Los factores C/EBP β y C/EBP δ se expresan de manera temprana durante la diferenciación adipogénica. Algunos experimentos de pérdida de función para ambas proteínas son controversiales, sugiriendo que estos factores no son esenciales para la diferenciación adipogénica, aunque sí se observa una disminución en la capacidad de diferenciación (Rosen y MacDougald, 2006). Más específicamente, adipocitos obtenidos de ratones doble *knock-out* para *c/ebp β* y *c/ebp δ* presentan niveles de mRNA normales para PPAR γ y C/EBP α , sugiriendo que, *in vivo*, pueden existir poblaciones celulares capaces de expresar estos factores de transcripción de manera independiente a la regulación por C/EBP β y C/EBP δ .

PPAR γ y la forma C/EBP α presentan el mismo curso temporal de expresión en diversas líneas celulares. Se ha propuesto un modelo de activación de los PPARs y C/EBPs durante la adipogénesis, en el cual se sitúa a PPAR γ como un marcador temprano de la diferenciación adipogénica (Figura 4), y su actividad iría decayendo a medida que progresa la maduración de la célula (Rangwala y Lazar, 2000; Rosen y col. 2000). Sin embargo, diversos estudios demuestran que puede existir adipogénesis, aunque a niveles disminuidos, en ratones *knock-out* para *c/ebp α* . Esta situación difiere de lo observado en ratones *knock-out* para *ppary*, en los cuales no existe adipogénesis incluso en presencia de niveles adicionales de C/EBP α , sugiriendo que C/EBP α puede

funcionar más como un mecanismo de control de PPAR γ en lugar de un factor de transcripción con función proadipogénica directa (Rosen, 2005).

3. Patogénesis de la Osteoporosis

Se han propuesto diversas teorías para explicar el reemplazo del tejido óseo por tejido adiposo en el estroma de la médula ósea de las mujeres postmenopáusicas. Una de las más aceptadas se relaciona con la disminución en el nivel de estrógenos observado después de la menopausia, puesto que la deficiencia de la hormona 17 β -estradiol (E₂) induce una pérdida de masa ósea acelerada en mujeres menopáusicas u ovariectomizadas (Horowitz, 1993; Ebeling y col. 1996). La importancia de la deficiencia de estrógenos se ve respaldada al observar una disminución de la incidencia de fracturas en mujeres mayores sometidas a terapia de reemplazo estrogénico. En este sentido, se ha propuesto que la síntesis local de estrógenos puede ejercer un efecto protector en la médula ósea, mediante la acción de la enzima aromatasa citocromo P-450, lo cual se ve respaldado por resultados de nuestro laboratorio que demuestran que esta enzima aumenta su actividad durante la diferenciación temprana de MSCs hacia el linaje osteogénico (Pino y col. 2006).

Sin embargo, ya que los osteoblastos y los adipocitos provienen de un precursor común, las MSCs, en los últimos años se ha planteado la "teoría lipídica de la osteoporosis", que postula que en la osteoporosis ocurre una disminución del número de células osteoblásticas en la médula ósea, asociada a un aumento en el número de células adiposas (Parhami y col. 1999). Por lo tanto, es de gran interés estudiar los posibles mecanismos mediante los cuales los procesos adipogénicos y osteogénicos podrían relacionarse en el estroma de la médula ósea, y cómo factores externos podrían regular esta relación.

3.1. Mecanismos putativos de la protección mediada por el sobrepeso frente a la osteoporosis: Leptina.

Una observación interesante que se ha realizado en el estudio de la osteoporosis es el hecho de que las mujeres con sobrepeso presentan una reducción en la probabilidad de desarrollar osteoporosis (Thomas, 2003). Se ha sugerido, por ende, que existiría una relación entre el tejido adiposo y la protección frente a la osteoporosis, para lo cual se han propuesto diversas explicaciones. Por ejemplo, se ha postulado que la "carga mecánica" podría ejercer un efecto positivo sobre el tejido óseo; sin embargo, el efecto protector del sobrepeso se observa incluso en huesos que no están sometidos a carga (Thomas y Burguera, 2002).

También se ha postulado que la leptina podría ser el mediador del efecto protector del tejido adiposo (para una revisión, refiérase a Cock y Auwerx, 2003). La leptina es una proteína de 17 kDa codificada por el gen *ob*, la cual es producida y secretada principalmente por los adipocitos y, en menor medida, por otros tipos celulares. Ha surgido, en los últimos años, una gran controversia respecto del efecto de leptina sobre el metabolismo óseo. Por una parte, se ha descrito a la leptina como una hormona que presenta un rol anorexogénico en el sistema nervioso cerebral, a nivel hipotalámico, regulando el apetito y actuando como un agente antiosteogénico (Harada y Rodan, 2003; Ducy y col. 2000a; Ducy y col. 2000b), ya que la inyección intracerebroventricular de leptina en ratones *knock-out ob-/-* disminuye la densidad mineral ósea (Ducy y col. 2000a). Sin embargo, otros autores han observado un efecto positivo sobre la osteogénesis, tanto en ratones (Hamrick y col. 2005), como en células humanas (Chang y col. 2006) y en líneas celulares (Thomas y col. 1999; Reseland y col. 2001). Un segundo enfoque del problema ha consistido en la búsqueda de una correlación entre los niveles plasmáticos de leptina y la DMO, con resultados opuestos

(existen muchos estudios al respecto, pero a modo de ejemplo refiérase a Kontogianni y col. 2004, donde no se encuentra correlación, y a Reid, 2002, quien presenta un trabajo que demuestra una correlación positiva). Por lo tanto, el estudio de la señalización de leptina se ha convertido en un tema de investigación de gran interés.

Leptina ejerce su efecto mediante receptores de unión de transmembrana (Ob-R), los cuales existen como 6 isoformas que tienen un dominio extracelular de unión a ligando, y motivos ricos en cisteínas. Cinco de estas isoformas poseen también un dominio citoplasmático y uno intracelular (Margetic y col. 2002; Hegyi y col. 2004; Sweeney, 2002). Desde el punto de vista funcional, existen tres isoformas: una forma larga (ob-Rb), una corta (ob-R) y una forma soluble (ob-sR). Los receptores ob-Rb y ob-R se encuentran próximos en la membrana plasmática, y la unión de leptina a la forma ob-Rb produce un cambio conformacional que permite la aproximación de dos dominios de unión a JAKs, los cuales se activan, transfosforilando otras JAK y residuos tirosina en el ob-Rb, e induciendo finalmente la activación de las vías de señalización STAT y MEK/ERK (Shida y col. 2005). De esta manera, leptina podría ejercer su efecto pro-osteogénico a través de estas rutas de señalización intracelular.

La evidencia señalada anteriormente sugiere que leptina tiene, efectivamente, un efecto pro-osteogénico en MSCs. Nuestro grupo de trabajo ha demostrado recientemente que las MSCs de donantes postmenopáusicas normales y osteoporóticas expresan el receptor de leptina de membrana (Hess y col. 2005). También se ha descrito la expresión de leptina en cultivos primarios (Laharrague y col. 1998; Mackay y col. 2006). Sin embargo, existe una pregunta que no ha sido respondida aún: ¿Existen diferencias en la capacidad de respuesta a leptina entre pacientes osteoporóticas y mujeres sanas? Si existen diferencias, ¿A que nivel se

producen? En esta tesis, se realizarán experimentos tendientes a responder, en parte, esta pregunta.

3.2. Relación entre PPAR γ , Runx2 y el envejecimiento.

Hemos resumido varios aspectos de la diferenciación osteogénica y adipogénica, la participación de factores de transcripción específicos, la regulación de las vías de diferenciación y mecanismos que podrían mediar una protección frente a la osteoporosis.

Adicionalmente, existen antecedentes que sugieren que PPAR γ puede interactuar e inhibir a Runx2. Se ha reportado la inhibición de la expresión de Runx2 y de la diferenciación osteoblástica terminal por PPAR γ en la línea celular UAMS-33 (Lecka-Czernik y col. 1999) y en la línea celular murina MC3T3-E1 (Jeon y col. 2003, Khan y Abu-Amer, 2003), y se ha observado un aumento en la masa ósea en ratones haploinsuficientes para PPAR γ (PPAR γ ^{+/-}), los cuales presentan mayor masa ósea (Akune y col. 2004).

De la misma manera, se ha sugerido que puede existir una relación entre la adipogénesis y la osteogénesis. Un reporte reciente sugiere que, en un modelo murino, el envejecimiento disminuye el compromiso de MSCs hacia el linaje osteoblástico, y aumenta el compromiso hacia la diferenciación adipogénica, junto con una disminución en la expresión de Runx2 y un aumento en la expresión de PPAR γ (Moerman y col. 2004). Otro trabajo reciente describe la inhibición de la diferenciación osteoblástica de MSCs, pero no la diferenciación adipogénica, por el suero de donantes de edad avanzada en comparación con el suero de donantes jóvenes (Abdallah y col. 2006). Respecto a las vías de señalización que podrían estar regulando la interacción entre

osteogénesis y adipogénesis, se ha descrito recientemente que los osteoblastos pueden controlar directamente el compromiso de células precursoras mediante la secreción de proteínas de la familia Wnt, aumento en los niveles de β -catenina en las células precursoras, y una concomitante disminución de PPAR γ (Zhou y col. 2007). Considerando la evidencia disponible, se puede establecer que PPAR γ no es solamente importante para la diferenciación adipogénica, sino también como integrador de señales extracelulares que culminan en el compromiso de una célula precursora hacia un determinado linaje.

Experimentos realizados recientemente en nuestro laboratorio han demostrado que no existen diferencias significativas en los niveles de Runx2, evaluados mediante western blot e inmunofluorescencia, entre MSCs obtenidas de donantes sanas y osteoporóticas, ni tampoco en los niveles de fosforilación de este factor de transcripción. Además, no se observan diferencias en los niveles de Runx2 cuando se adiciona BMP-2 al medio de cultivo¹ (Pablo Astudillo, Tesis de Pregrado, 2007). Estos resultados sugieren, *a priori*, que la vía de diferenciación osteogénica se encuentra operando de manera normal en las MSCs tanto de donantes sanas como osteoporóticas, y que el aumento en la adipogénesis en las células troncales de mujeres con osteoporosis podría deberse a una regulación diferencial de la vía de diferenciación adipogénica, posiblemente reflejada en cambios a nivel de PPAR γ . Por lo tanto, es de interés evaluar la respuesta adipogénica reflejada a nivel de PPAR γ , en MSCs de ambos tipos de donantes, con el fin de encontrar posibles diferencias entre ambos tipos de células.

¹ Resultados que forman parte de la Tesis de Pregrado entregada por este mismo autor, aprobada en Julio del presente año, como parte de los requisitos para obtener el título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

HIPOTESIS DE TRABAJO

La mayor capacidad de diferenciación de las MSCs de donantes osteoporóticas hacia el linaje adipogénico se refleja en una alteración en la expresión y/o fosforilación del factor de transcripción esencial de la adipogénesis PPAR γ , y en un efecto diferencial de leptina sobre la abundancia y/o fosforilación de esta proteína, en comparación con las MSCs de donantes sanas.

OBJETIVOS GENERALES Y ESPECIFICOS

1. Objetivo General

Determinar si existen diferencias en la abundancia y fosforilación de PPAR γ en MSCs humanas obtenidas de donantes sanas y osteoporóticas, sometidas a diferenciación adipogénica y en presencia o ausencia de un estímulo con leptina.

2. Objetivos Específicos

1. Determinar la abundancia relativa de los transcritos *ppar γ* , *c/ebp α* , *ap2* y *adipsina*, en MSCs de donantes sanas y osteoporóticas, cultivadas con medio de diferenciación adipogénico (MA) y con MA suplementado con leptina, mediante RT-PCR.
2. Medir la abundancia de PPAR γ , en MSCs de donantes sanas y osteoporóticas, cultivadas con MA y MA suplementado con leptina, mediante inmunofluorescencia y western blot.

3. Medir el grado de fosforilación de PPAR γ en MSCs de donantes sanas y osteoporóticas, cultivadas con MA y MA suplementado con leptina, mediante western blot.
4. Determinar la abundancia relativa del transcrito del gen *ob*, en MSCs de donantes sanas y osteoporóticas, cultivadas con MA y MA suplementado con leptina, mediante RT-PCR.
5. Medir los niveles de leptina y del receptor soluble de leptina, en la médula ósea y en plasma de sangre periférica, en donantes sanas y osteoporóticas.

MATERIALES Y METODOS

1. Selección de las pacientes donantes y obtención de MSCs

Las donantes que participaron en este estudio fueron seleccionadas de acuerdo a los siguientes criterios: sexo, edad, valores de densidad mineral ósea, ausencia de patologías que puedan asociarse con osteoporosis, que no se encuentren en terapia de reemplazo estrogénico durante la postmenopausia o en cualquier otro tipo de terapia que pudiera afectar al tejido óseo y que no tengan alguna enfermedad ósea asociada o alguna patología que afecte el tejido óseo.

Todas las donantes fueron pacientes postmenopáusicas de sexo femenino, afectadas por fractura de cadera o de algún miembro inferior, que ingresaron al Servicio de Ortopedia y Traumatología del Hospital Sótero del Río, para someterse a procedimientos quirúrgicos asociados a este tipo de lesiones. Se clasificó a las donantes como normales u osteoporóticas, de acuerdo al *t score* observado en las vértebras lumbares L₂-L₄ (escogidas porque presentan una menor probabilidad de interferencia con estructuras óseas adyacentes), que corresponde a la densidad mineral ósea (DMO) de un paciente comparado con la DMO de una población de referencia en su máximo de masa ósea (25 años). Las donantes normales corresponden a aquellas que presentaban un *t score* mayor a -2,5 veces la desviación estándar respecto al valor de referencia (es decir, *t score* > -2,5); bajo este valor, las pacientes se consideraron osteoporóticas (*t score* < -2,5). La DMO se determinó mediante el método de absorciometría de doble energía radiológica (DEXA), en el Laboratorio de Densitometría del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, con un densitómetro Lunar DPX-L (Software 1.3z, Lunar Corp, Madison, WI, USA). A

cada una de las potenciales donantes, se le solicitó firmar un consentimiento informado donde autorizaban la obtención de una muestra de médula ósea durante el procedimiento quirúrgico. Este procedimiento se encuentra debidamente autorizado por los comités de ética del Hospital Sótero del Río y del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile. De manera adicional, de cada paciente se obtuvo una muestra de sangre periférica para la determinación de leptina (descrita más adelante).

En lo sucesivo, se denominará "C-MSCs" a las MSCs obtenidas de donantes sanas, y "O-MSCs" a las MSCs obtenidas de donantes osteoporóticas.

2. Obtención y Purificación de MSCs

Las MSCs fueron obtenidas por aspiración de 15 a 20 ml de médula ósea desde la cresta ilíaca de las donantes, siguiendo el protocolo descrito por Jaiswal y col. 1997. En resumen, los 15 a 20 ml de aspirado se agregaron a 20 ml de Dulbecco's Modified Eagles Medium, DMEM (Sigma, St. Louis, MO, USA), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Este medio se denominará en lo sucesivo, DMEM-SF. La mezcla del aspirado de médula ósea junto al DMEM-SF se centrifugó durante 5 minutos a 450 x g, para coleccionar las células y descartar la capa grasa presente en la muestra. Posteriormente, las células coleccionadas se resuspendieron en 10 ml de DMEM-SF suplementados con 80 µg/ml de gentamicina (NCPC, Hebei, China) y se separaron en un gradiente de densidad de Percoll al 70% (Sigma). El gradiente se centrifugó a 450 x g por 15 minutos, formándose tres fracciones, de acuerdo a la densidad: la fracción superior (1,03 g/ml), la fracción media (1,10 g/ml) y la fracción inferior (1,14 g/ml). De estas tres fracciones, se coleccionó la

fracción superior o de menor densidad, donde se encuentran mayoritariamente las MSCs.

La fracción recolectada se sometió a lavados sucesivos con DMEM-SF y las células obtenidas se sembraron en una densidad de 4×10^5 células/cm² (Naperville, IL, USA). Éste se denomina *cultivo primario*.

3. Expansión de MSCs *in vitro*

Una vez que el cultivo primario hubo alcanzado la confluencia, las células fueron liberadas de la placa mediante un tratamiento con tripsina suplementada con 0,25% EDTA (Sigma), durante 5 minutos, a 37 °C. Las células fueron removidas de la placa, centrifugadas a 450 x g por 5 minutos, y lavadas con PBS 1X (NaCl 0,14 M; KCl 2,6 mM; Na₂HPO₄·7H₂O 0,01 M; KH₂PO₄ 1,7 mM, ajustado a pH 7,2; todos los reactivos, US Biological, Swamscott, MA, USA), para luego ser resuspendidas y sembradas a una densidad de 4×10^3 células/cm² en medio DMEM-SF. Éste constituye el primer subcultivo. Todos los experimentos presentados en esta tesis fueron realizados en el quinto subcultivo, lo que permite estandarizar las condiciones de los ensayos y obtener una cantidad adecuada de células, sin comprometer su viabilidad y potencial de diferenciación.

4. Criopreservación de MSCs

Una fracción de las MSCs en segundo subcultivo fueron criopreservadas para su posterior utilización. Las células se liberaron de la placa como se describió anteriormente y se resuspendieron en una mezcla de criopreservación fría, compuesta por 90% de suero fetal bovino y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma). Las MSCs son transferidas a criotubos (Nunc, Naperville, IL, USA) a una concentración de 1×10^6

células/ml y fueron sometidas a descenso gradual de temperatura hasta alcanzar -196°C en nitrógeno líquido. Cabe señalar que, durante la realización de esta tesis, no se observaron diferencias en la viabilidad de MSCs frescas u obtenidas desde muestras criopreservadas.

5. Diferenciación Adipogénica de MSCs

Las MSCs de donantes controles y osteoporóticas fueron sometidas a un estímulo de diferenciación adipogénica, durante diferentes tiempos (entre 3 y 14 días). Para ello, las MSCs fueron lavadas dos veces con PBS 1X, y se reemplazó el medio basal DMEM-SF por medio adipogénico (MA), que está compuesto por DMEM-SF suplementado con dexametasona $1\ \mu\text{M}$ (Sigma), isobutilmetilxantina (IBMX) $0,45\ \text{mM}$ (Calbiochem, San Diego, CA, USA), indometacina $100\ \mu\text{M}$ (Sigma) e insulina humana $1,8\ \mu\text{M}$ (Novo Nordisk, Dinamarca). Para determinar el efecto de leptina sobre $\text{PPAR}\gamma$, el medio adipogénico se suplementó con $1\ \mu\text{g/ml}$ de leptina humana recombinante (Chemicon Internacional, Temecula, CA) en los tiempos señalados. Se determinó el grado de diferenciación adipogénica mediante tinción con Nile Red y citometría de flujo (FACS-Calibur, Beckton Dickinson, Franklin, NJ, USA), y además mediante visualización de depósitos de grasa por tinción con Oil Red (Sigma).

6. Inmunofluorescencia de MSCs

Las MSCs fueron sembradas sobre cubreobjetos de vidrio en placas de 24 pocillos. Tras el tratamiento respectivo, las células se lavaron dos veces con PBS 1X, y se fijaron con una solución de formaldehído al 3,7% (Sigma) en PBS 1X, durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se permeabilizaron con

una solución de formaldehído al 3,7 % más Tritón X-100 al 0,2% (Merck), por 5 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron dos lavados con PBS 1X, y se bloqueó con una solución de BSA al 3% (Gibco BRL Life Technologies) en TBS 1X (0,14 M NaCl; 2,7 mM KCl; 25 mM Tris Base; pH 8.0, todos los reactivos US Biological), por 45 minutos. Luego del bloqueo, las células se incubaron con el anticuerpo primario específico (anti-PPAR γ monoclonal, diluido 1:25 en la solución de bloqueo, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) durante 45 minutos a 37 °C. Se lavaron las células dos veces con PBS 1X, y se incubaron con el anticuerpo secundario respectivo, anti-ratón conjugado a FITC (Rockland, PA, USA), diluido en la solución de bloqueo, durante 45 minutos a 37 °C. Se lavaron las células tres veces con PBS 1X, una vez con agua destilada, y se montaron con medio de montaje. Las preparaciones se analizaron en un microscopio de fluorescencia (Nikon Corporation, Japan) y las imágenes fueron capturadas con una cámara digital (Kodak Digital Science DC120, Rochester, NY, USA).

7. Lisis Celular

Las células sometidas a diferentes tratamientos fueron lisadas de acuerdo al protocolo descrito por Lecka-Czernick y col. (1999). Brevemente, las células fueron incubadas con amortiguador de lisis (50 mM Tris-Cl, pH 7.5; 150 mM NaCl; 1% Nonidet P-40; 0,1 % SDS; 0,5 % deoxicolato de sodio; todos los reactivos de US Biological) durante 5 minutos, y luego fueron lisadas mediante rompimiento mecánico con un Cell Scraper (Orange Scientific, Bélgica). El lisado fue centrifugado a 19090 x g durante 15 minutos, y el sobrenadante, que contiene las proteínas, fue almacenado a -20 °C. Para la evaluación de PPAR γ , el lisado se almacenó con 0,5 mM de PMSF (Sigma), 0,5 mM

de ortovanadato de sodio (Sigma), 2 $\mu\text{g/ml}$ de leupeptina (US Biological), 1 $\mu\text{g/ml}$ de pepstatina (Sigma) y 2 $\mu\text{g/ml}$ de aprotinina (Sigma). La concentración de proteínas en los lisados celulares se midió utilizando un kit comercial basado en el método de Lowry, con modificaciones (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

8. Western Blot

Se denaturó 20 μg de lisado celular con amortiguador de carga (2% SDS, 10% glicerol, Tris 0,06 M pH 6.8, 0,01% azul de bromofenol, 20% β -mercaptoetanol) durante 5 minutos a 100 °C. Las proteínas fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE; Bio-Rad). Para la separación de PPAR γ , PPAR γ fosforilado (en lo sucesivo, p-PPAR γ), y β -actina, se utilizó un gel al 8%. Luego, las proteínas separadas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) o PVDF (de su nombre en inglés, *Polyvinylidene fluoride*; Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA, USA), durante 1 hora a 100 V. Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 5% en TBS-Tween 0,05% o en BSA 3% en TBS-Tween 0,05% durante 1 hora e incubadas con el anticuerpo primario correspondiente durante 16 horas (dilución 1:500 del anticuerpo anti-PPAR γ ; dilución 1:3000 del anticuerpo anti-p-PPAR γ ; dilución 1:5000 del anticuerpo anti- β -actina; el anticuerpo anti-PPAR γ fue adquirido a Santa Cruz Biotechnology; el anticuerpo anti-p-PPAR γ fue adquirido a Upstate, y el anticuerpo anti- β -actina, a Sigma). Se realizaron tres lavados con TBS-Tween 0,05% y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a peroxidasa en dilución 1:5000 (anticuerpos anti-ratón y anti-conejo, Rockland) durante 2 horas. Las bandas inmunoreactivas fueron visualizadas mediante un kit de quimioluminiscencia (Perkin

Elmer). Para realizar una estimación del control de carga, las membranas incubadas con los anticuerpos anti-PPAR γ o anti-p-PPAR γ , fueron incubadas con una solución (Tris Base 0,5 M; SDS 10%; β -mercaptoetanol al 0,7%, en H₂O destilada) durante 15 minutos con agitación a 60 °C, para liberar los anticuerpos adheridos a la membrana, y éstas posteriormente fueron bloqueadas nuevamente e incubadas con el anticuerpo anti- β -actina, y se visualizaron las bandas inmunoreactivas, como se describió anteriormente.

Para la cuantificación de la intensidad de las bandas, se reveló las bandas inmunoreactivas utilizando películas radiográficas (películas estándar, AGFA; películas sensibles Hyperfilm, para revelado de PPAR γ , Amersham Biosciences, UK). Las películas fueron digitalizadas y luego analizadas utilizando el software densitométrico Kodak Molecular Imaging Software 1D, identificando las bandas a cuantificar de acuerdo al tamaño molecular correspondiente.

En todas las cuantificaciones de intensidad de bandas mediante el análisis con el programa Kodak Molecular Imaging Software 1D, se sustrajo el valor del background o "ruido" del valor de intensidad de las bandas de la imagen analizada.

9. Determinación de leptina (Ob) y receptor soluble de leptina (Ob-sR) en plasma de médula ósea y sangre periférica

Se obtuvo muestras de sangre periférica y de médula ósea de cada paciente, según se indicó previamente. Se tomó 1 ml de muestra y centrifugó a 316 x g por 5 minutos. Se rescató el plasma y fue almacenado a -20 °C hasta su utilización. Se determinó la cantidad de leptina (Ob) y de su receptor soluble (Ob-sR) mediante ELISA, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (kit para la detección de leptina,

Linco Research, MO, USA; kit para la detección del receptor soluble de leptina, R&D Systems, MN, USA). Brevemente, 25 μ l (para la detección de leptina) o 50 μ l (para la detección del receptor soluble) de muestra se agregan en los respectivos pocillos de una placa de 96 pocillos, previamente tratada con buffer de ensayo provisto por el fabricante, y se incubó a temperatura ambiente por 2 horas, luego de lo cual se lavó y se adicionó el anticuerpo respectivo, la solución sustrato para la detección, y se leyó la absorbancia a 450 nm y 590 nm. En cada caso, se realizó la determinación en duplicado, se incorporó una curva estándar, provista por el fabricante, y se evaluó la absorbancia de controles negativos.

10. Extracción de RNA y RT-PCR

Las células fueron sembradas en placas de 60 mm (Nunc) a una densidad de 7×10^3 células/cm². Para la extracción, las células fueron liberadas de la placa mediante tratamiento con tripsina como se indicó anteriormente, se centrifugaron a 316 x g por 5 minutos y se agregó 1 ml de RNAWiz (Ambion, Austin, TX, USA). La extracción se realizó de acuerdo al protocolo del fabricante. El RNA extraído se cuantificó en un espectrofotómetro (MBE2000, Perkin Elmer, Boston, MA) y se almacenó a -80 °C (Freezer IIShin, Modelo DF 9007, Korea).

La integridad del RNA se visualizó mediante geles denaturantes de agarosa (Fermelo Biotec, Chile). Brevemente, se disolvió 0,72 g de agarosa en 45 ml de agua DEPC; esta mezcla se dejó enfriar hasta 65 °C, y se agregó una mezcla de MOPS 10X (MOPS 0,4 M pH 7,0, Winkler Ltda., Chile; acetato de sodio 0,1 M, Winkler Ltda.; EDTA 0,01 M, Merck) y formaldehído al 37%. Las muestras de RNA (4 μ l) se prepararon para la visualización en agarosa con 6 μ l de agua libre de nucleasas (Mo Bio, Carlsbad, CA,

USA), 9 μ l de formamida (Winkler Ltda.), 3 μ l de formaldehído 37%, 2 μ l de MOPS 10X y 0,5 μ l de bromuro de etidio (Winkler Ltda.), se denaturaron a 70 °C por 10 minutos, y se enfriaron en hielo por 2 minutos. Las muestras preparadas se sometieron a electroforesis durante 40 minutos a 80 V y, posteriormente, el RNA en los geles se visualizó con un transiluminador ultravioleta (Fotodyne Incorporated, New Berlin, WI, USA).

El DNA complementario (cDNA) se sintetizó utilizando la transcriptasa reversa M-MLV (Promega, Madison, WI, USA), mediante un ciclo de 15 minutos a 45 °C, enfriamiento en hielo por 5 minutos, y una extensión de 45 minutos a 70 °C, como describe el fabricante. Para las reacciones de PCR, se amplificó 300 ng de cDNA con 30 μ l de mezcla de reacción (solución amortiguadora de reacción 1X, Invitrogen; 1,5 mM MgCl₂, Invitrogen; 6 pmol de cada partidor, 22,3 μ l de agua libre de nucleasas; 0,2 mM de dNTPs, Omega Bio-Tek, Doraville, GA, USA; 2,5 U de Taq polimerasa, Invitrogen). En la tabla 1 se muestra la secuencia de los partidores utilizados en este trabajo, la temperatura de denaturación (T_m) y los tamaños esperados de los productos de PCR. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1,2%. Para ello, se disolvió 0,48 g de agarosa en 40 ml de buffer TAE 1X (Winkler Ltda.). Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis durante 30 minutos a 100 V, y posteriormente las bandas fueron visualizadas en un transiluminador UV, y el gel fue fotografiado utilizando una cámara digital Nikon Coolpix 4500 (Nikon Corporation).

Como control positivo de la amplificación de los transcritos de los genes adipogénicos, se utilizó RNA extraído desde adipocitos de glándula mamaria, proporcionados gentilmente por el Dr. Jorge Martínez del Laboratorio de Biología

Celular, INTA. Adicionalmente, como segundo control independiente de la expresión de *ppary*, se utilizó RNA extraído desde la línea celular HepG2, proporcionada gentilmente por el Dr. Mauricio González, del Laboratorio de Bioinformática y Expresión Génica, INTA. Para cada pareja de partidos, se realizaron amplificaciones de PCR utilizando distintos números de ciclos (variando entre 29 y 39 ciclos), con el fin de realizar los análisis posteriores en una etapa lineal de amplificación. Finalmente, como una aproximación para estimar la equivalencia de las cargas de cDNA utilizadas en cada reacción de PCR, se amplificó el transcrito del gen correspondiente a *gpdh* (Vandesompele y col. 2002), en una reacción independiente, debido a las diferencias en la temperatura de denaturación, y número de ciclos.

11. Análisis Estadístico

Para comparar los distintos grupos de datos en los experimentos realizados con los cultivos celulares, así como para evaluar el efecto de leptina, se realizó la prueba de *t* de student. Todos los experimentos fueron realizados en al menos tres muestras controles y tres muestras osteoporóticas (a menos que se indique un número de muestras diferente). Para evaluar significancia estadística en las características evaluadas entre las donantes sanas y osteoporóticas (IMC, DMO y *t score*), así como diferencias en la abundancia de leptina y de su receptor soluble en suero, se realizó la Prueba de *t* de student.

Tabla 1. Partidores utilizados para la amplificación por PCR. Se indican los partidores sentido (arriba, en la columna "Secuencia") y antisentido (abajo). pb, pares de bases.

Gen	Secuencia	Nº de ciclos	Tm (°C)	Tamaño Producto PCR (pb)
<i>ppary</i>	5' CAGTGGGGATGCTCATAA 3' 5' CTTTGGCATACTCTGTGAT 3'	35	54	422
<i>c/ebpα</i>	5' GGCGGGGACCCAGGGAGTG 3' 5' GCATTGGAGCGGTGAGTTTG 3'	37	60	281
<i>adipsina</i>	5' CAAGCAACAAAGTCCCGAGC 3' 5' CCTGCGTTCAAGTCATCCTC 3'	36	57	261
<i>leptina</i>	5' GTAGAGTTTGAAGGAGGTGA 3' 5' CTGGGAATTAGCCATTGTG 3'	35	57	349
<i>ap2</i>	5' AACCTTAGATGGGGGTGTCCTG 3' 5' TCGTGGAAGTGACGCCTTTC 3'	36	58	125
<i>gpdh</i>	5' ACCACAGTCCATGCCATCAC 3' 5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3'	29	60	452

RESULTADOS

1. Establecimiento de cultivos de MSCs de donantes sanas y osteoporóticas

Para este trabajo de tesis, se utilizó células troncales mesenquimáticas de donantes postmenopáusicas, obtenidas mediante aspiración de la médula ósea, las cuales se cultivaron de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Las MSCs de donantes sanas y osteoporóticas en cultivo presentaron una morfología similar, de tipo fibroblástico, siendo las células de donantes osteoporóticas, usualmente de mayor diámetro y menor longitud (Figura 5).

Las células fueron subcultivadas sucesivamente hasta el quinto subcultivo, donde los cultivos presentaron un alto grado de homogeneidad morfológica.

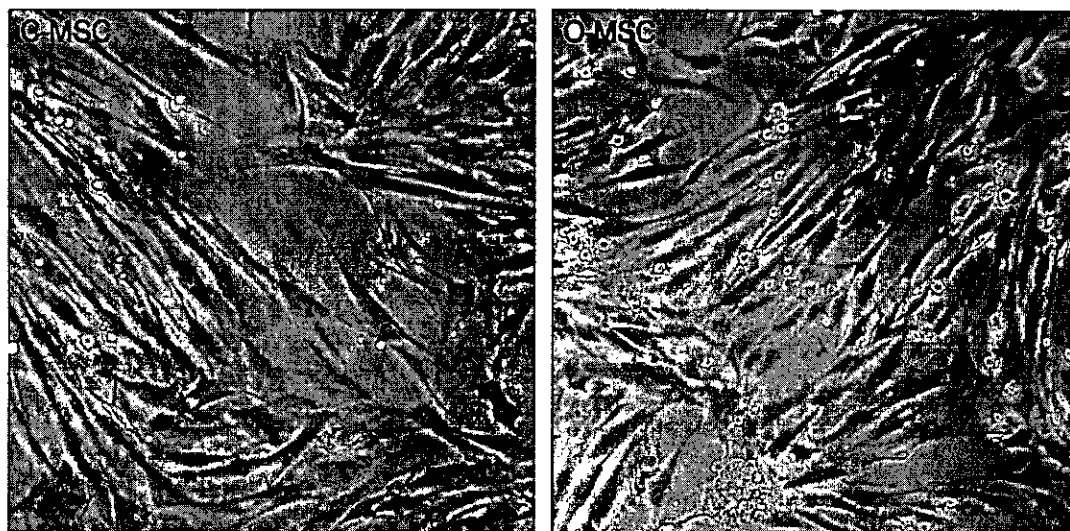


Figura 5. MSCs en Cultivo. Fotografía de contraste de fases (10X) de células troncales mesenquimáticas en cultivo, obtenidas de donantes sanas (C-MSC, izquierda) y de donantes osteoporóticas (O-MSC, derecha), correspondientes a un cultivo primario.

2. Diferenciación adipogénica de MSCs

2.1. Determinación de la diferenciación adipogénica de MSCs.

En presencia de medio adipogénico, la aparición de adipocitos puede visualizarse mediante la tinción de los depósitos de grasa con Oil Red. La Figura 6 muestra el aspecto típico que exhiben las MSCs cultivadas tanto en medio basal (Figura 6, A) como en medio adipogénico durante 14 días (Figura 6, B y C). No se observa aparición de adipocitos en las MSCs cultivadas en medio basal, a diferencia de los cultivos en presencia de medio de diferenciación.

La diferenciación hacia adipocitos puede determinarse cuantitativamente mediante citometría de flujo, utilizando la tinción con Nile Red. El porcentaje de MSCs positivas para Nile Red varía entre 8% y 15% en las MSCs de donantes sanas, y entre 16% y 29% en las MSCs de donantes osteoporóticas.

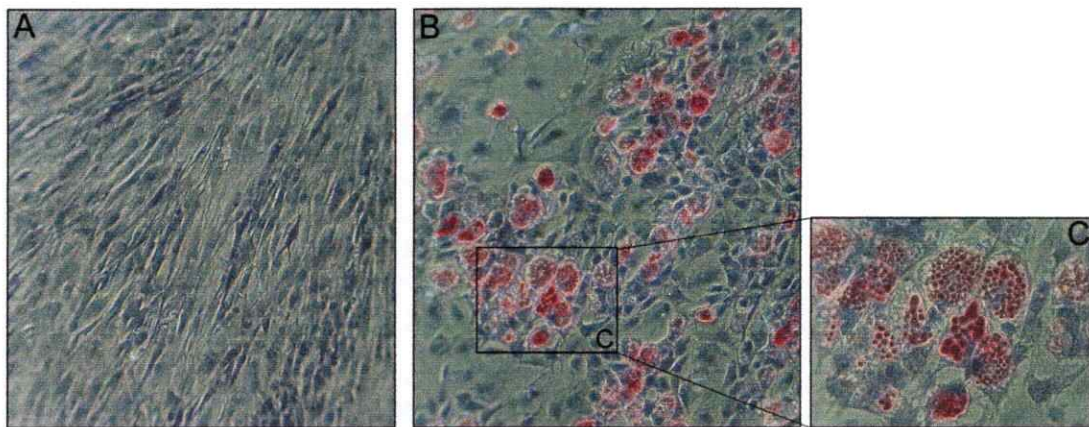


Figura 6. Diferenciación adipogénica de MSCs. Las MSCs fueron cultivadas en medio basal o en medio adipogénico, según se indica, y fueron teñidas con Oil Red. **(A)** MSCs cultivadas en medio basal, 10X; **(B)** MSCs cultivadas 14 días con medio adipogénico, 10X; **(C)** Detalle de los depósitos de grasa visualizados por tinción con Oil Red, 40X.

2.2. Expresión y localización de PPAR γ en C-MSCs y O-MSCs cultivadas en condiciones adipogénicas, visualizada mediante inmunofluorescencia.

Se cultivaron células durante 7 días con medio adipogénico, para evaluar la presencia y localización del factor de transcripción PPAR γ mediante inmunofluorescencia. Se observó la presencia de PPAR γ en las MSCs obtenidas de una donante sana y una donante osteoporótica, tanto en la condición basal como durante la diferenciación (Figura 7). A los 7 días de diferenciación, se observa una mayor abundancia de PPAR γ en las O-MSCs (Figura 7), mientras que se aprecian bajos niveles de PPAR γ en las C-MSCs. El análisis densitométrico de las imágenes obtenidas revela que esta diferencia es significativa ($p=0.0102$). Además, en las C-MSC se puede observar localización citoplasmática de PPAR γ . También se observa un mayor abundancia de PPAR γ , en la condición basal, en las O-MSC, en comparación con las C-MSC ($p=0,002$).

Estos resultados sugieren que existe un mayor nivel de PPAR γ en las MSCs de donantes osteoporóticas, comparado a lo observado en las MSC de donantes normales. Además, se observa que las O-MSCs que presentan marca para PPAR γ , presentan depósitos de grasa (Figura 8).

Al adicionar leptina al medio de diferenciación adipogénico, se observa una tendencia hacia una menor intensidad en la señal positiva para PPAR γ , aunque sin observarse diferencias significativas. El control sin anticuerpo primario demuestra que la señal es específica del anticuerpo anti-PPAR γ (Figura 7).

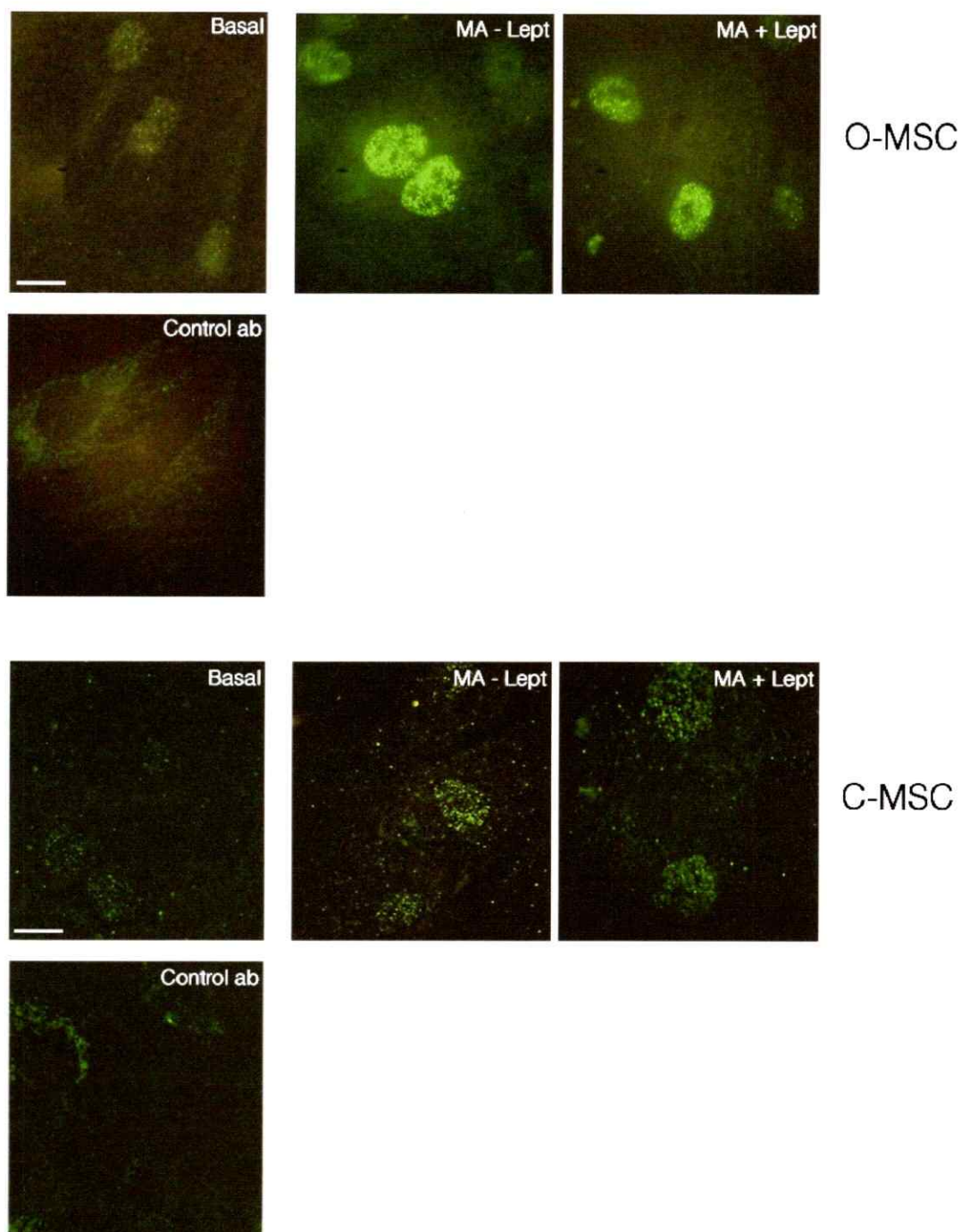


Figura 7. Inmunofluorescencia para PPAR γ en MSCs. Las células de donantes sanas (C-MSC, n=1) y osteoporóticas (O-MSC, n=1) fueron cultivadas en medio basal y medio adipogénico (MA) en ausencia (- Lept) y presencia (+ Lept) de 1 μ g/ml de leptina durante 7 días. Control ab, control negativo (sin anticuerpo primario); barra = 10 μ m. Se muestra un experimento representativo (véase Materiales y Métodos).

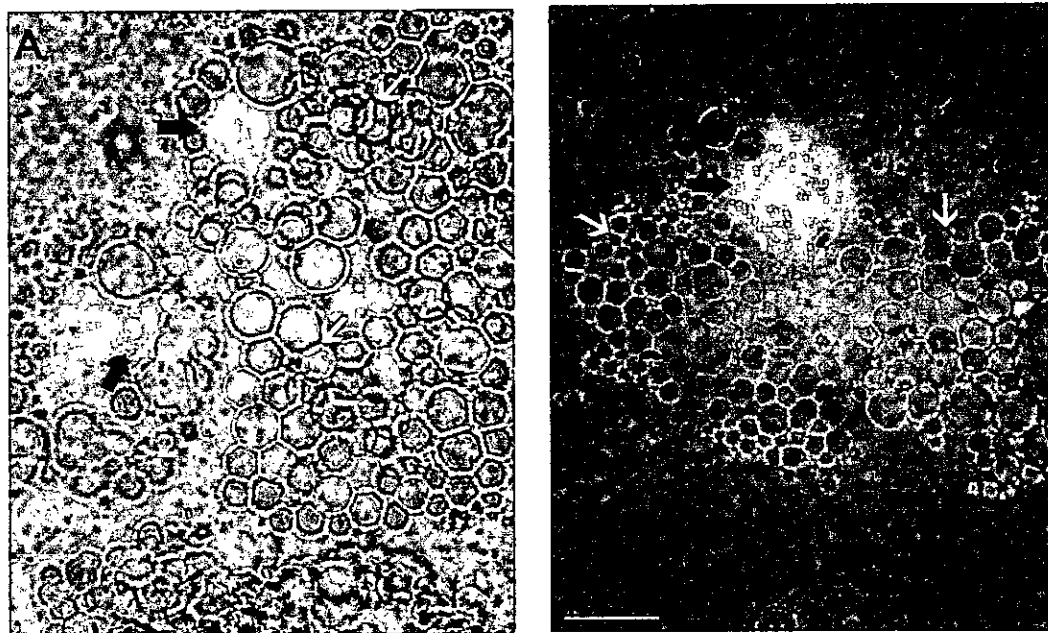


Figura 8. Depósitos de grasa en O-MSCs positivas para PPAR γ . Las MSCs fueron preparadas para inmunofluorescencia, y aquellas positivas para PPAR γ fueron fotografiadas con el campo claro para captar los depósitos de grasa circundantes. **(A)** O-MSC cultivadas en MA durante 15 días. **(B)** O-MSCs cultivadas en MA + Leptina durante 15 días. Se indican núcleos marcados para PPAR γ (flechas negras, \blackrightarrow) y depósitos de grasa (flechas blancas, \rightarrow). Barra = 10 μ m.

2.3. Análisis de la expresión de PPAR γ durante la adipogénesis, mediante Western Blot

Si bien mediante inmunofluorescencia se analizó la abundancia de PPAR γ en sólo una muestra normal y una osteoporótica, los resultados obtenidos sugieren que existen diferencias en el nivel de la expresión de PPAR γ entre MSCs de donantes sanas y osteoporóticas. Para confirmar estas observaciones, se evaluó la expresión de PPAR γ mediante Western Blot. Al comparar los niveles de PPAR γ entre las C-MSCs y O-MSCs en condiciones basales, se observa que existe una mayor abundancia de este factor de transcripción en las O-MSCs respecto a las C-MSCs (Figura 9).

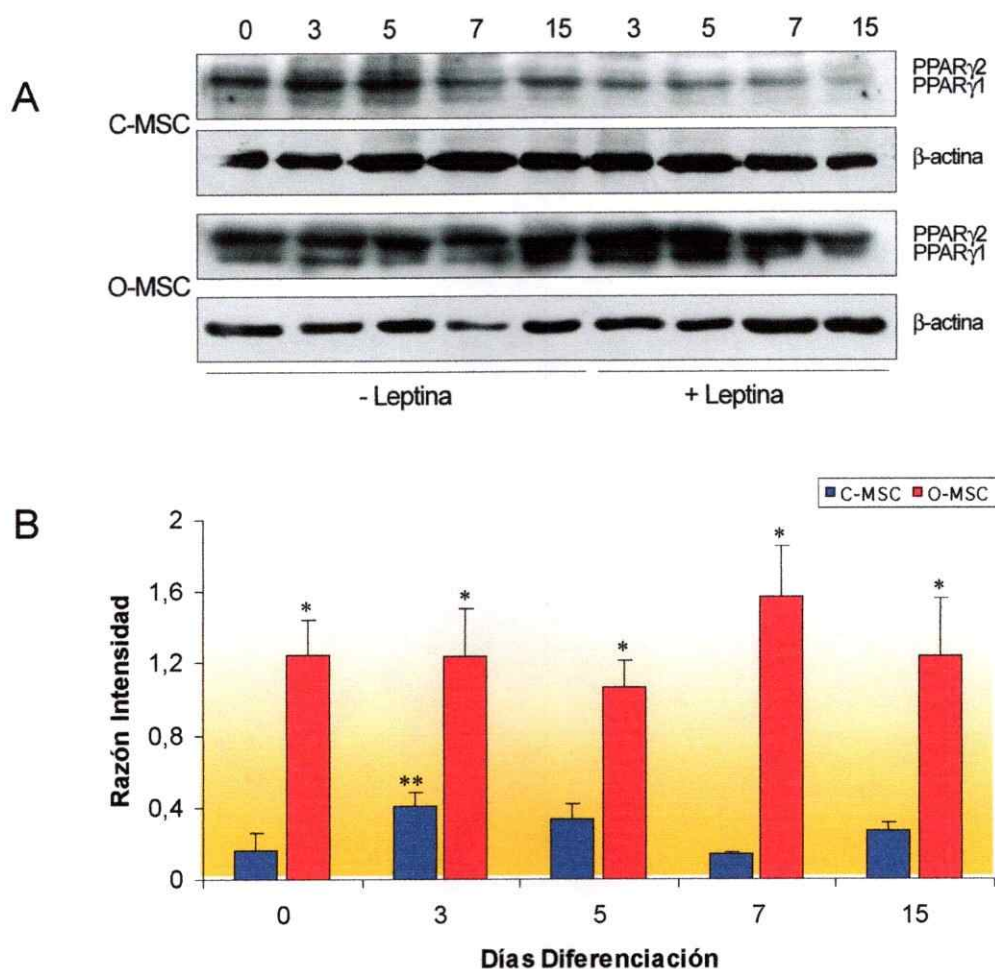


Figura 9. Expresión de PPAR γ en MSCs, evaluada mediante Western Blot. Las MSCs fueron cultivadas en medio basal y en medio adipogénico durante los tiempos señalados. **(A)** Western Blot representativo de una muestra control (C-MSC) y una muestra osteoporótica (O-MSC). Las dos bandas observadas corresponden a las isoformas PPAR γ 2 y PPAR γ 1. - Leptina, MSCs cultivadas en ausencia de leptina; + Leptina, MSCs cultivadas en presencia de leptina. **(B)** Abundancia relativa de PPAR γ (suma de ambas isoformas) en C-MSC (barras rojas; n=3) y O-MSC (barras azules; n=3) cultivadas en medio adipogénico sin leptina. Las bandas fueron normalizadas por β -actina. * $p < 0,05$, Test de t de student, comparado con el valor de las C-MSC; ** $p < 0,05$, Test de t de student, comparado con el día 0 de diferenciación. Los datos son expresados como promedio \pm error estándar.

Al evaluar la expresión de PPAR γ en cada muestra, se puede observar en las C-MSCs una tendencia hacia un aumento en la abundancia relativa entre los 3 y 7 días de diferenciación. Sin embargo, en las O-MSCs, se observa que los niveles de PPAR γ permanecen elevados y relativamente constantes durante todo el curso de la diferenciación (Figura 9, B).

2.4. Efecto de leptina sobre la expresión de PPAR γ durante la adipogénesis, evaluado mediante Western Blot

Al adicionar leptina al medio de diferenciación, se aprecia una tendencia hacia una disminución en el nivel de PPAR γ en las MSCs de donantes normales (Figura 9, A); sin embargo, este cambio no se observa en las O-MSCs.

En las C-MSCs cultivadas en el medio adipogénico suplementado con leptina, se observa una disminución de los niveles de PPAR γ comparados a los que se encuentran en estas mismas células cultivadas con medio adipogénico sin leptina (Figura 10). Esta diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0,05$) a los 3 días de diferenciación, y la tendencia se mantiene a los 5 días de diferenciación. Este efecto inhibitorio de leptina no se aprecia en las MSCs obtenidas de donantes osteoporóticas, siendo los niveles de PPAR γ similares tanto en medio adipogénico como en el medio adipogénico suplementado con leptina.

Estos resultados sugieren que el factor de transcripción adipogénico PPAR γ se encuentra en abundancia distinta en las MSCs de donantes sanas, comparadas a las MSCs de donantes osteoporóticas, tanto en condiciones basales como durante la diferenciación adipogénica.

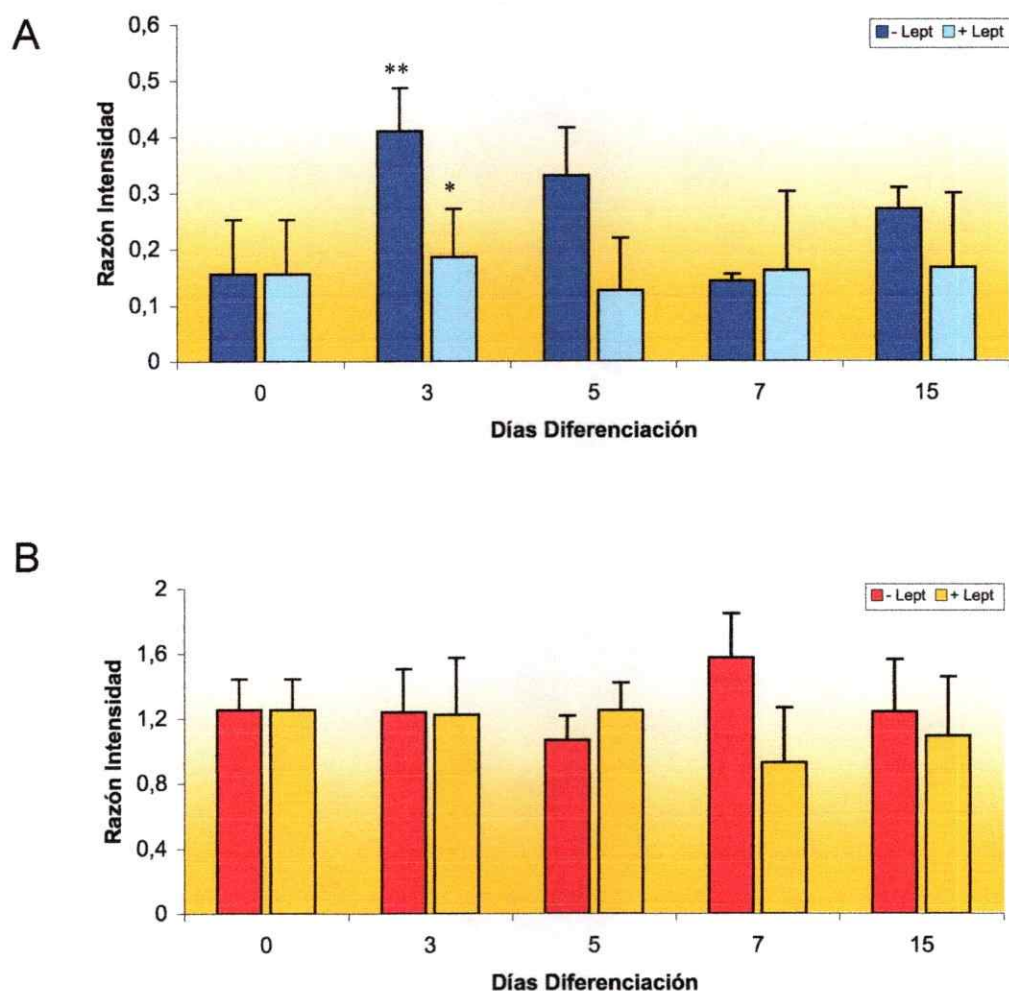


Figura 10. Efecto de leptina sobre la expresión de PPAR γ en MSCs, evaluada mediante Western Blot. Las bandas obtenidas mediante Western Blot (Figura 12, A) fueron cuantificadas y luego normalizadas por β -actina. **(A)** Efecto de leptina sobre PPAR γ en C-MSC (n=3). Las células fueron cultivadas en medio adipogénico (MA; barras azules) y en MA suplementado con leptina (MA+ Lept, barras celestes). *, p < 0,05 respecto al tratamiento sin leptina; **, p < 0,05 respecto al día 0. **(B)** Efecto de leptina sobre PPAR γ en O-MSC (n=3). Barras rojas, C-MSC cultivadas en MA; barras en color naranja, O-MSC cultivadas en MA + Lept. Los datos son expresados como promedio \pm error estándar.

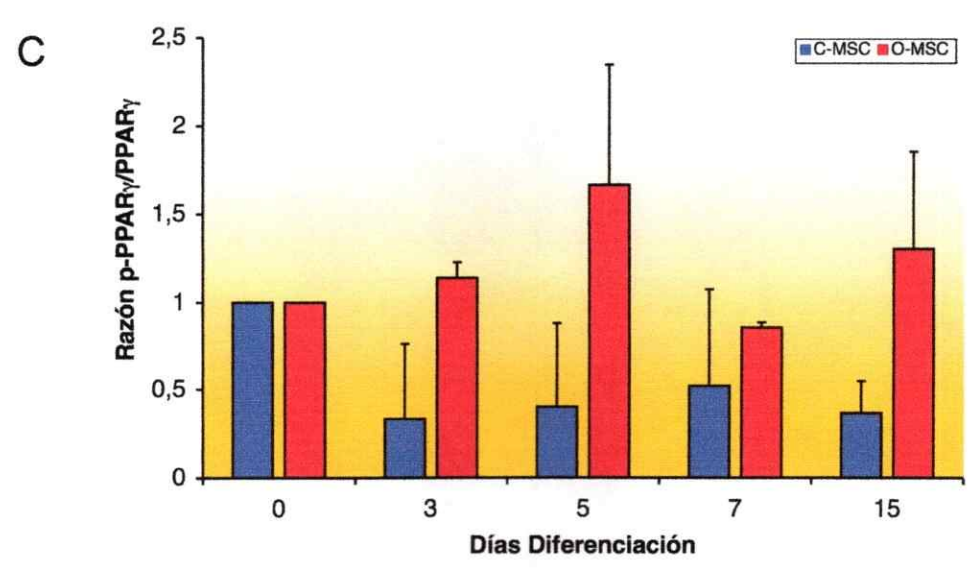
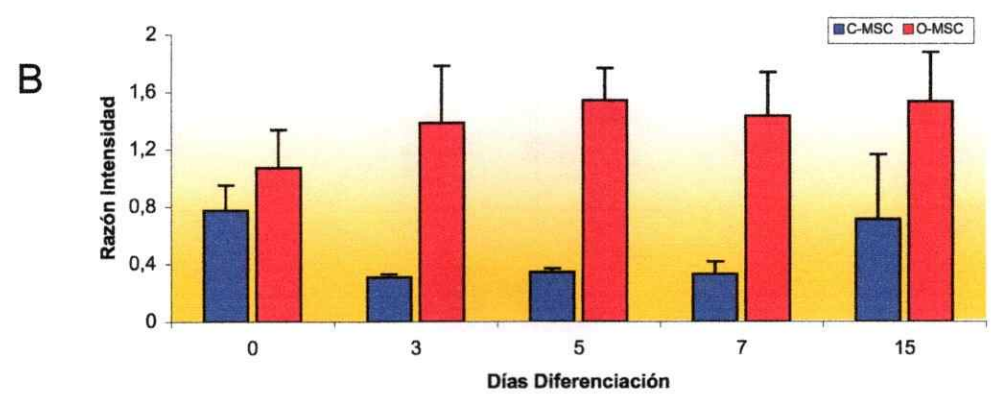
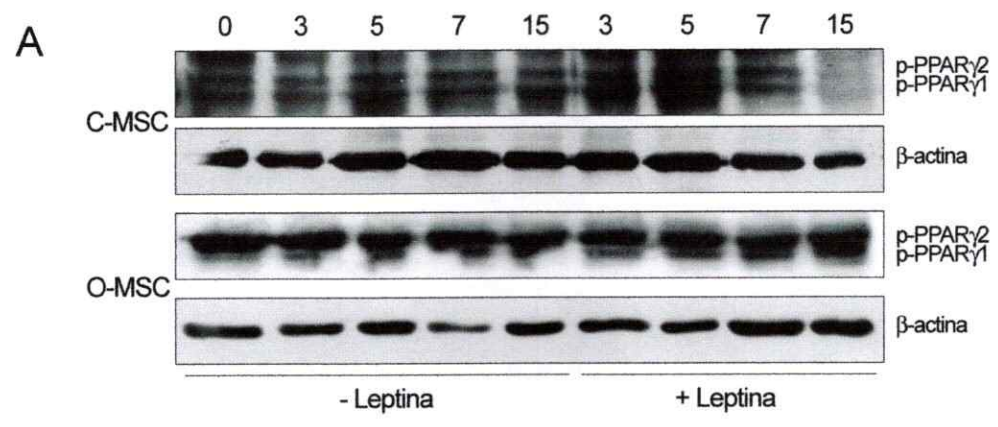
2.5. Análisis de la fosforilación de PPAR γ durante la adipogénesis, mediante Western Blot

En primer lugar, al observar el nivel de p-PPAR γ en las C-MSCs, se observa una tendencia hacia una disminución de la fosforilación entre los 3 y 7 días de

diferenciación, para luego aumentar hacia el día 15 de diferenciación, hasta un nivel similar al de la condición basal (Figura 11, B). Es interesante señalar que, entre los 3 y 7 días de diferenciación, la disminución observada de la forma fosforilada de PPAR γ en las C-MS, coincide con el aumento en los niveles de PPAR γ total. Al calcular la razón p-PPAR γ /PPAR γ total, en este período, se corrobora una tendencia hacia una disminución de esta razón en las C-MS (Figura 11, C), lo que sugiere que este período es relevante para el rol que este factor de transcripción pueda ejercer en la célula troncal.

Al medir el nivel de p-PPAR γ en las O-MS, se observa que los niveles permanecen constantes durante todo el período estudiado de la diferenciación adipogénica (Figura 11, B). Finalmente, al comparar la razón neta p-PPAR γ /PPAR γ total calculada, entre las O-MS y las C-MS durante la diferenciación adipogénica, se observa que las O-MS presentan una razón de $0,95 \pm 0,36$ tras 7 días de diferenciación; sin embargo, las C-MS presentan una razón de $2,35 \pm 1,12$. Si bien esta diferencia no es estadísticamente significativa, se observa una clara tendencia hacia una razón mayor de p-PPAR γ /PPAR γ total en las células de donantes sanas, sugiriendo una mayor abundancia de PPAR γ activo en las MS de donantes osteoporóticas.

(Página Siguiende). Figura 11. Fosforilación de PPAR γ (p-PPAR γ) en MS, evaluada mediante Western Blot. (A) Western Blot representativo de una muestra control (C-MS) y una muestra osteoporótica (O-MS). Las dos bandas observadas corresponden a las isoformas PPAR γ 2 y PPAR γ 1. (B) Abundancia relativa de p-PPAR γ en C-MS (barras rojas; n=2) y O-MS (barras azules; n=3). Las bandas fueron normalizadas por β -actina. Los datos son expresados como promedio \pm error estándar. (C) Razón p-PPAR γ /PPAR γ total en C-MS (barras azules, n=2) y O-MS (barras rojas, n=2). Se normalizaron los valores respecto a la condición basal, de manera de observar el cambio en la razón durante la diferenciación adipogénica.



2.6. Efecto de leptina sobre la fosforilación de PPAR γ durante la adipogénesis, mediante Western Blot

Al cultivar las C-MSCs en medio adipogénico suplementado con leptina, no se aprecia la disminución en el nivel de p-PPAR γ entre los 3 y 7 días observada en estas mismas células cultivadas en el medio adipogénico sin leptina, y se mantienen en el nivel observado en la condición basal (Figura 12, A). La diferencia en el nivel de p-PPAR γ es estadísticamente significativa para el día 3 de diferenciación ($p < 0,05$). Cabe señalar que, al medir el nivel de PPAR γ total, también se observó un efecto significativo de leptina a los 3 días de diferenciación, sugiriendo que en este período, leptina ejerce un importante efecto sobre PPAR γ en las MSCs de donantes sanas.

El efecto de leptina observado en las C-MSCs no se aprecia en las O-MSCs (Figura 12, B), ya que en estas células el nivel de p-PPAR γ permanece constante y elevado, respecto al nivel observado en las C-MSCs, durante todo el curso de la diferenciación adipogénica, ya sea en ausencia o presencia de leptina.

Al calcular el efecto de leptina sobre la razón p-PPAR γ /PPAR γ total, se observa una tendencia de las C-MSCs a presentar una razón mayor durante el cultivo con medio adipogénico suplementado con leptina, en comparación con el cultivo con medio adipogénico sin leptina. Esta tendencia no se observa en las O-MSCs (Figura 13).

Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que existen diferencias en los niveles de p-PPAR γ en las MSCs de donantes osteoporóticas, comparadas con las MSCs de donantes sanas, y además existe una respuesta diferencial frente a la adición de leptina. Estas diferencias son significativas a los 3 días de diferenciación, y se mantienen como tendencia durante períodos posteriores de diferenciación adipogénica.

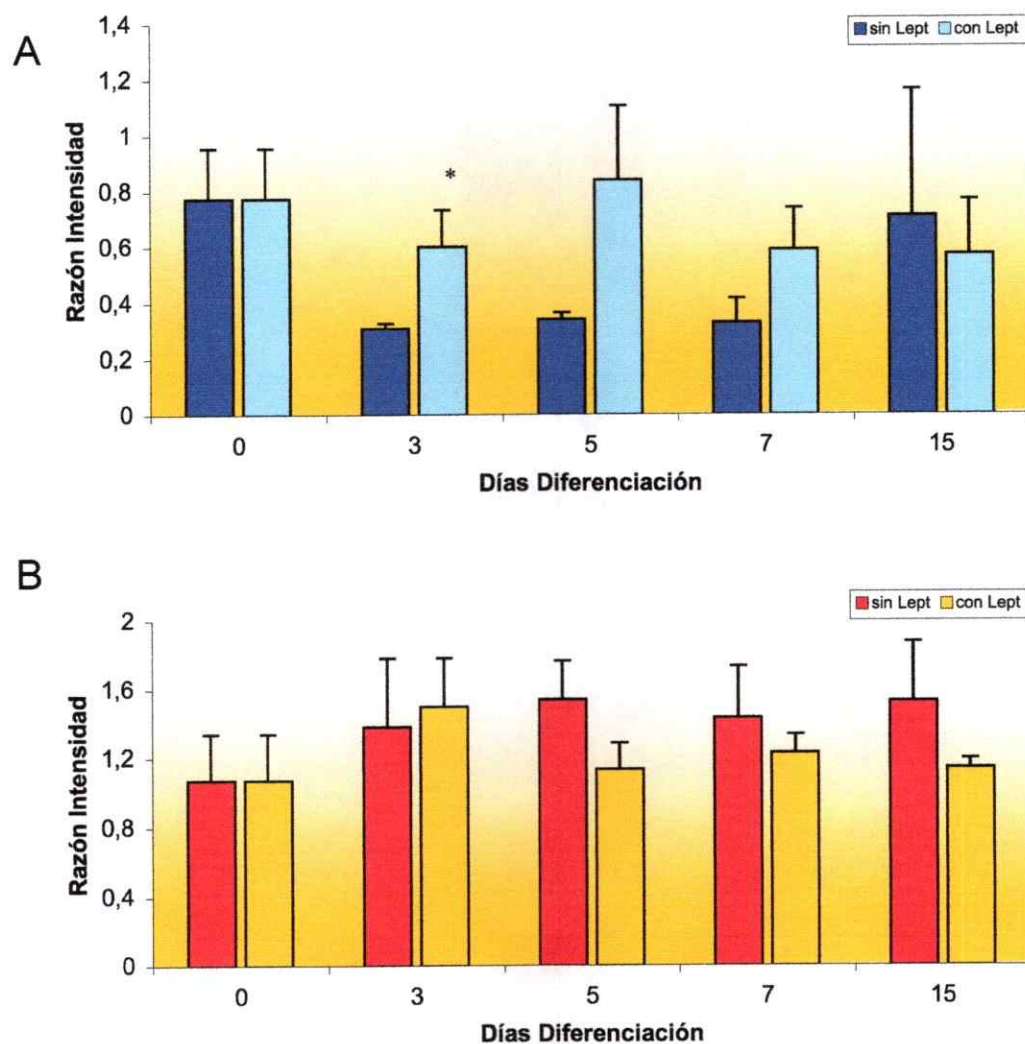


Figura 12. Efecto de leptina sobre la abundancia de PPAR γ fosforilado. Las MSCs fueron cultivadas en medio basal y en medio adipogénico durante los tiempos señalados. **(A)** Efecto de leptina sobre p-PPAR γ en C-MSC (n=2). El efecto de leptina es significativo a los 3 días de diferenciación (*p < 0,05; test de t de student). **(B)** Efecto de leptina sobre p-PPAR γ en O-MSC (n=3). Barras azules y rojas, MSCs cultivadas en medio adipogénico (MA); barras celestes y naranjas, MA + Leptina. Los datos son expresados como promedio \pm error estándar.

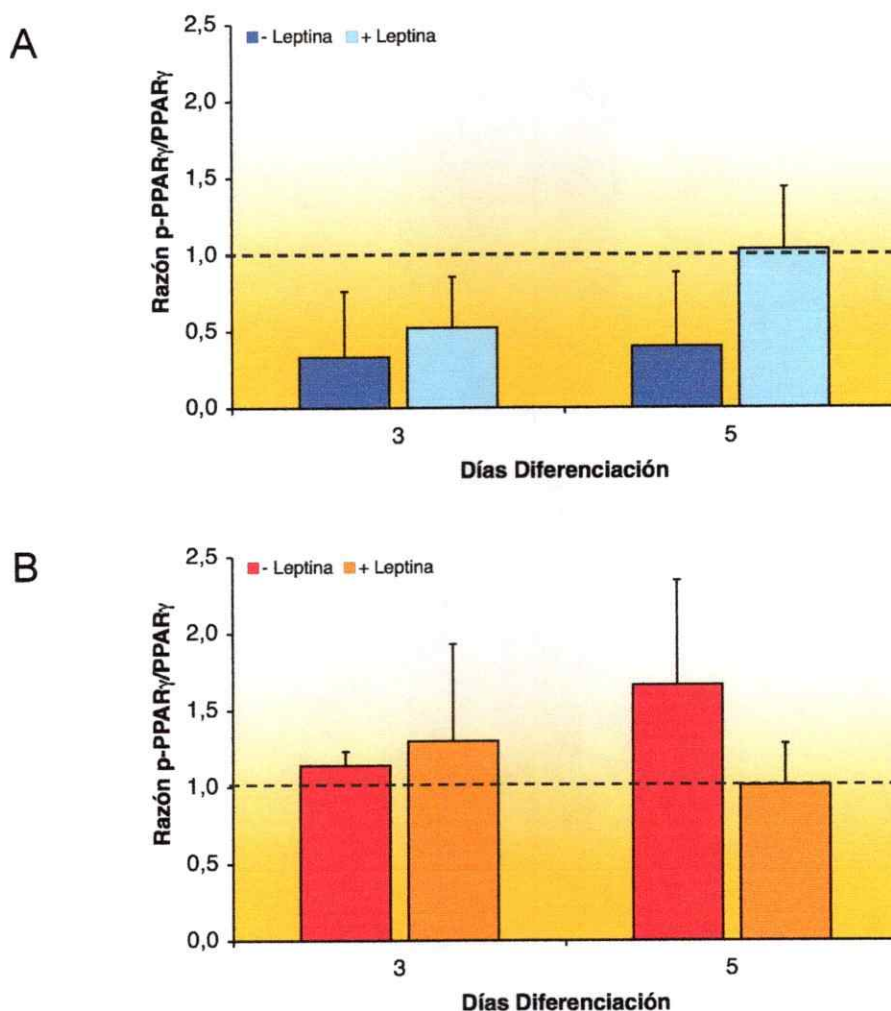


Figura 13. Razón p-PPAR γ /PPAR γ total en MSCs. (A) Razón p-PPAR γ /PPAR γ total en C-MSC cultivadas en medio adipogénico (barras azules, n=2), en medio adipogénico suplementado con leptina (barras celestes, n=2). **(B)** Razón p-PPAR γ /PPAR γ en O-MSC cultivadas en medio adipogénico (barras rojas, n=2), en medio adipogénico suplementado con leptina (barras naranjas, n=2). En ambos casos, se muestran los resultados para los días 3 y 5 de diferenciación, a modo ilustrativo. La línea segmentada indica razón p-PPAR γ /PPAR γ total=1, correspondiente al valor basar (valores de cada muestra normalizados respecto a su respectiva condición basal).

2.7. Expresión de marcadores de diferenciación adipogénica de MSCs.

Para evaluar la expresión de marcadores característicos de la adipogénesis, se determinó la abundancia relativa de transcritos de genes relacionados con la vía adipogénica, en MSCs obtenidas de una donante sana y una osteoporótica: *ppary*,

c/ebp α y las adipoquinas *adipsina* (serina proteasa secretada por los adipocitos) y *ap2* (proteína miembro de las "fatty acid binding protein", utilizada ampliamente como marcador de adipocitos).

Se observó la expresión del transcrito correspondiente a *ppary* en C-MSCs y O-MSCs (Figura 14); sin embargo no se observó diferencias significativas entre ambos tipos de muestras, ni tampoco entre el cultivo en medio adipogénico y el medio adipogénico suplementado con leptina. Se observó un perfil similar de expresión para el transcrito de *c/ebp α* .

La abundancia del marcador *ap2* también fue comparable entre ambos tipos de muestras, observándose el transcrito a partir del día 3 de diferenciación adipogénica. La abundancia del transcrito de *adipsina* se mantiene en forma constante a través del período de diferenciación en las C-MSCs, mientras que en las O-MSCs se pudo observar un aumento a los 7 días. La expresión del transcrito disminuyó cuando las O-MSCs se cultivaron en medio adipogénico suplementado con leptina.

Preliminarmente, estos resultados muestran que las MSCs obtenidas de donantes sanas y osteoporóticas, sometidas a diferenciación adipogénica, expresan los transcritos de genes relacionados con la vía adipogénica, lo que se correlaciona con la diferenciación adipogénica observada en estas células, evaluada por el depósito de lípidos mediante tinción con Oil Red y citometría de flujo, como se ha descrito previamente por nuestro laboratorio (Hess y col. 2004, Pino y col. 2006).

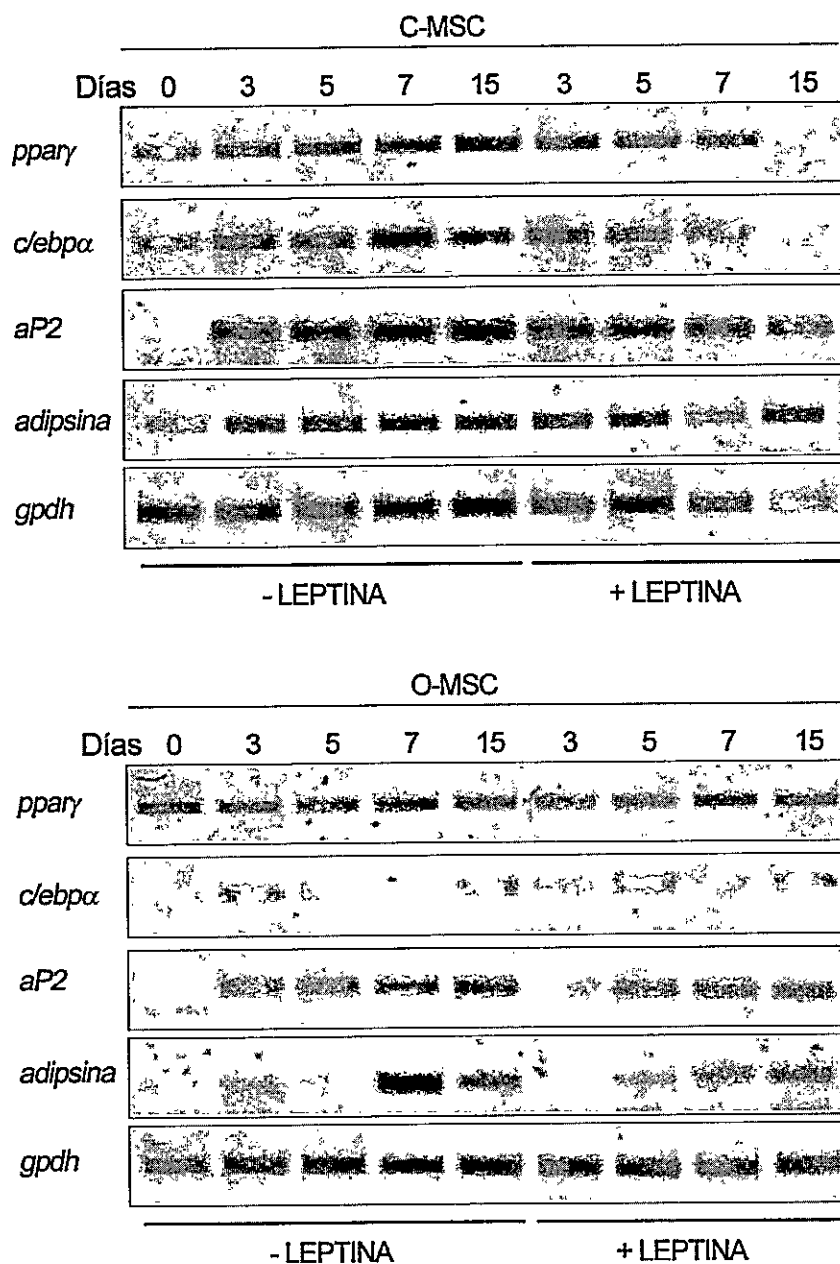


Figura 14. Expresión de marcadores adipogénicos en las MSCs, evaluado mediante RT-PCR. Las MSCs fueron cultivadas en medio basal y en medio adipogénico durante los días señalados, luego de lo cual se extrajo el RNA mediante el procedimiento indicado. - Leptina, medio adipogénico; + Leptina, medio adipogénico suplementado con leptina. Se evaluó la abundancia del transcrito de *gpdh* como gen constitutivo (véase Materiales y Métodos).

3. Expresión y biodisponibilidad de leptina

3.1. Niveles plasmáticos de leptina (Ob) y de su receptor soluble (Ob-sR) en plasma de médula ósea y de sangre periférica

Considerando los resultados obtenidos, es de interés determinar si existen diferencias en los niveles de leptina entre C-MSD y O-MSD. Es posible que las donantes osteoporóticas presenten una insensibilidad a leptina, o bien tengan niveles más bajos de esta proteína, o bien una combinación de ambas situaciones.

Con el fin de evaluar posibles diferencias en los niveles de leptina, se determinó la concentración de esta proteína en el plasma de la médula ósea y de sangre periférica, en donantes sanas y con osteoporosis. Para este análisis, se excluyó a las donantes que presentaban valores de Índice de Masa Corporal (IMC) mayor a 30 Kg/m². El valor de IMC en el grupo de las donantes sanas analizadas fue de 26,39 ± 0,54 Kg/m², versus un valor de 24,87 ± 0,72 Kg/m² en el grupo de las donantes osteoporóticas (Tabla 2). Esta diferencia no es estadísticamente significativa. Al realizar la medición de leptina, se observó que las donantes sanas presentan mayores niveles que las donantes osteoporóticas (Figura 15, A). Ya que entre ambos grupos de donantes no existe diferencia estadística en el valor de IMC, se puede inferir que la diferencia observada en el nivel de leptina es independiente del valor de IMC. Cabe señalar que no se observaron diferencias significativas en los niveles de leptina entre plasma obtenido de la médula ósea y del obtenido de sangre periférica, en ninguno de los dos tipos de donantes.

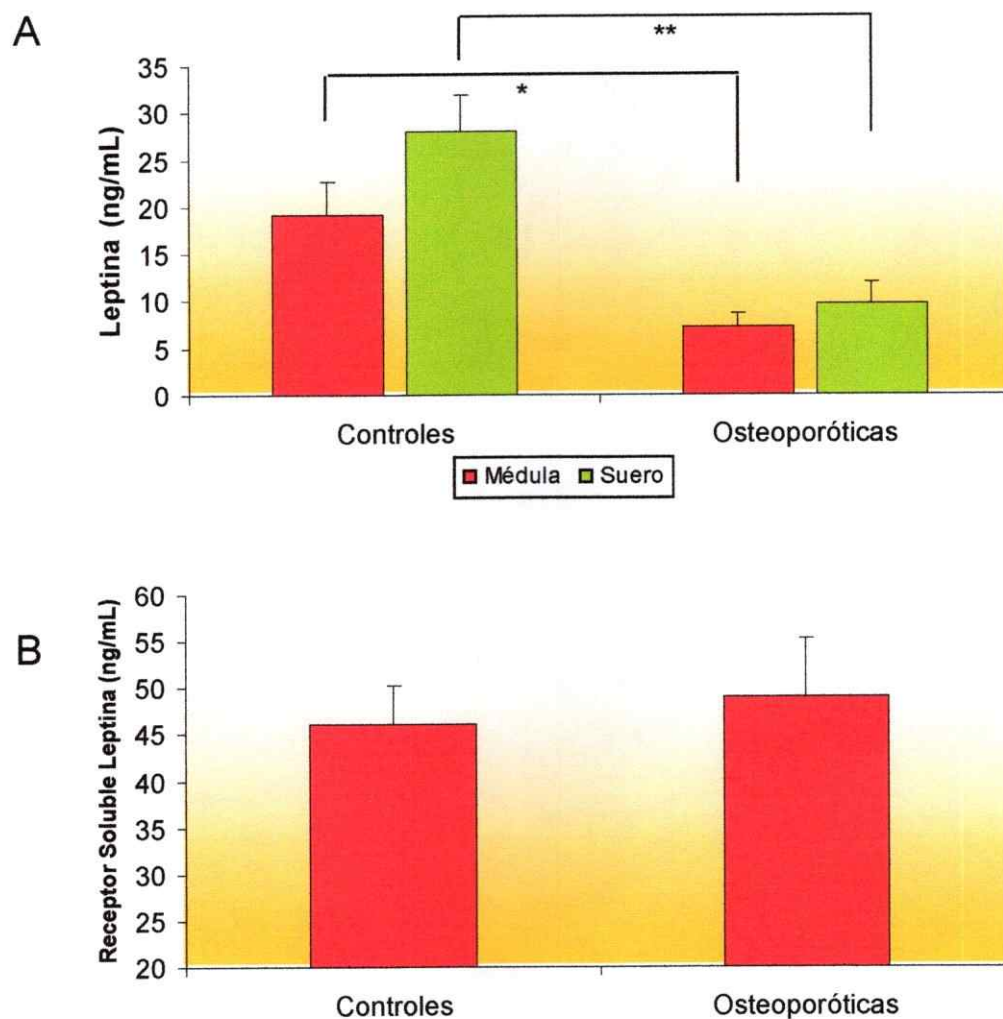


Figura 15. Abundancia de leptina y su receptor soluble en el plasma. (A) Niveles de leptina en el suero de médula ósea (barras rojas) y de sangre periférica (barras verdes), en donantes controles ($n=14$) y osteoporóticas ($n=11$). *, diferencia entre niveles de leptina en suero de médula, $p < 0,05$, prueba de t de Student; **, diferencia entre niveles de leptina en suero de sangre periférica, $p < 0,05$, prueba de t de Student. **(B)** Abundancia del receptor soluble de leptina (barras rojas) en el suero de médula ósea, en donantes sanas y osteoporóticas. Los datos son expresados como promedio \pm error estándar.

Al determinar los niveles de Ob-sR, no se observan diferencias significativas entre las donantes sanas y las osteoporóticas (Figura 15, B). Al calcular la razón Ob/Ob-sR, se observa una razón mayor en el plasma de las donantes sanas (0,61), comparado con la razón en el plasma de las donantes osteoporóticas (0,20), lo que

puede sugerir posibles diferencias en la biodisponibilidad de leptina en ambos tipos de muestras.

Característica	Donantes Sanas	Donantes Osteoporóticas	<i>p</i>
IMC (Kg/m ²)	26,39 ± 0,54	24,87 ± 0,72	0,054
<i>t</i> score	-1,14 ± 0,21	-3,49 ± 0,42	9,08E-05
Edad	71,1 ± 4,62	73,07 ± 6,07	0,401

Tabla 2. Características de las donantes analizadas. Se realizaron mediciones de peso, estatura y *t* score, en donantes sanas (n=14) y donantes osteoporóticas (n=11), además de la toma de muestra respectiva para realizar la medición de los niveles de leptina y el receptor soluble.

3.2. Abundancia relativa del gen *ob* en MSCs de donantes sanas y osteoporóticas.

Considerando las diferencias observadas a nivel de la abundancia de leptina en la médula ósea de las donantes, es de interés determinar si las MSCs pueden expresar leptina. Debido a problemas metodológicos, no fue posible determinar la concentración de leptina en el medio de cultivo condicionado de estas células, por lo que se observó la abundancia relativa del transcrito del gen *ob*, codificante para leptina, en MSCs de una donante sana y una osteoporótica, como experimento preliminar para obtener información sobre posibles diferencias en la capacidad de las MSCs para expresar leptina.

Se observó expresión del transcrito a partir del día 3 de diferenciación en las C-MSC, mientras que en las O-MSC el transcrito está presente sólo a partir del día 5 de diferenciación (Figura 16). Al agregar leptina al medio de cultivo, en ambos casos se observó que la intensidad de la banda correspondiente aumenta. En las C-MSC, existe una tendencia hacia un aumento en la abundancia del transcrito a partir del día 3 de

diferenciación, mientras que en las O-MSC, ese aumento se observa al día 5 de diferenciación.

Estos resultados, si bien preliminares, sugieren que pueden existir diferencias en la abundancia del gen *ob*, entre células de donantes osteoporóticas, versus las de donantes sanas.

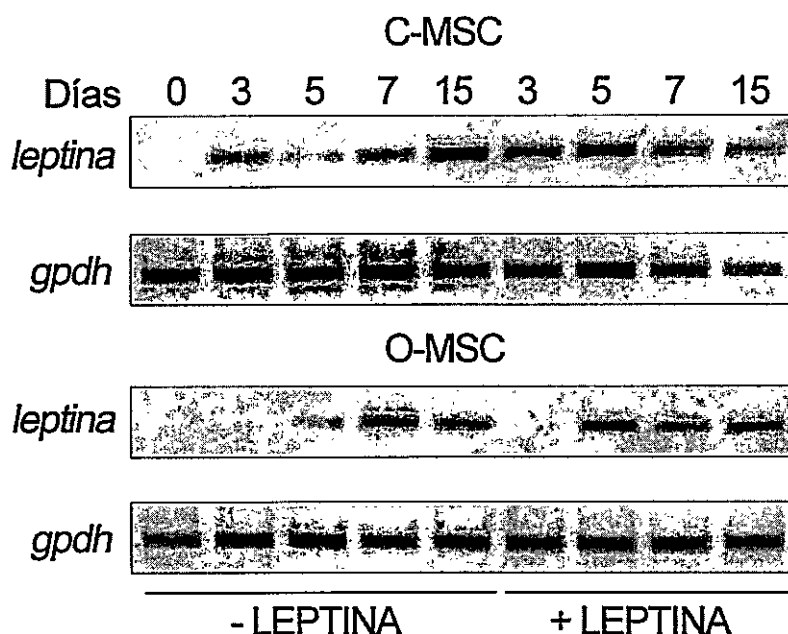


Figura 16. Abundancia relativa del gen *ob* (*leptina*). Se evaluó la abundancia del transcrito del gen que codifica para leptina, mediante RT-PCR, para lo cual las células fueron cultivadas en medio adipogénico, durante los días señalados, en ausencia y presencia de leptina. - Leptina, medio adipogénico; + Leptina, medio adipogénico suplementado con leptina. Se evaluó la abundancia del transcrito de *gpdh* como gen constitutivo (véase Materiales y Métodos).

DISCUSION

En este trabajo, se evaluó la respuesta de las MSCs obtenidas de la médula ósea de donantes postmenopáusicas sanas y osteoporóticas, frente a un estímulo adipogénico, lo que se realizó a tres niveles: a) expresión de marcadores adipogénicos; b) expresión de PPAR γ , y c) fosforilación de PPAR γ . Además, se estudió el efecto de leptina sobre los parámetros anteriores, además de la expresión de leptina mediante RT-PCR por las MSCs y la abundancia de leptina en las muestras de médula ósea. Cada uno de estos puntos será abordado a continuación.

1. Respuesta frente al estímulo adipogénico de las MSC.

La capacidad de diferenciación hacia el linaje adipogénico de las MSCs obtenidas de donantes postmenopáusicas ha sido comprobada por trabajos realizados en nuestro laboratorio (Rodríguez y col. 2000; Hess y col. 2005; Pino y col. 2006). En esta tesis, con el fin de corroborar la respuesta frente al estímulo adipogénico de las MSCs, se realizaron tinciones con Oil Red, para visualizar los depósitos de grasa correspondientes. Además, se realizó una evaluación cualitativa de la respuesta de las MSCs frente a un estímulo adipogénico, a nivel de expresión génica, mediante RT-PCR.

Si bien el proceso adipogénico ha sido extensivamente estudiado, son pocos los trabajos que han analizado la expresión de PPAR γ en células precursoras humanas durante un curso temporal de diferenciación, centrándose la mayoría de ellos en evaluar la expresión de este factor de transcripción tras 14 o más días de diferenciación. Los resultados reportados tanto en células humanas como animales

muestran diferencias con los presentados en esta tesis, fundamentalmente en el tiempo de expresión de PPAR γ . Estas diferencias pueden ser explicadas por diferencias metodológicas o bien por el modelo utilizado. Así, un reporte reciente que estudia la expresión de *ppary*, *c/ebp α* y *ap2* en MSCs de donantes adultos encuentra que la expresión de estos transcritos se detecta recién a partir del día 7 de diferenciación (Sekiya y col. 2004). Las diferencias observadas pueden ser explicadas, en este caso, por diferencias metodológicas; en el trabajo de estos autores no se informa la edad de los donantes, y se basa en cultivos derivados de colonias, a diferencia de los cultivos utilizados en la presente Memoria de Tesis. Además, los autores no analizan los días 3 y 5 de diferenciación, a diferencia de lo realizado en esta tesis. Debido a que la formación de tejido adiposo en la médula ósea es un fenómeno asociado al envejecimiento, entonces es esperable que la expresión de *ppary* también presente una asociación similar, como se ha reportado recientemente (Misso y col. 2005). Por lo tanto, la edad de las donantes utilizadas para obtener las MSCs puede afectar también el tiempo de aparición de *ppary*.

En un trabajo más reciente, en que se analiza el perfil de expresión de PPAR γ en un modelo murino de pérdida de masa ósea en condiciones de gravedad cero (las que se obtienen suspendiendo a los animales de la cola, con lo cual se simulan las condiciones que los astronautas encuentran en el espacio), se ha observado un aumento en la expresión de este factor de transcripción en MSCs sometidas a diferenciación adipogénica, tras 7 días de diferenciación, aunque no se analiza tiempos más tempranos (Ahdjoudj y col. 2005). Sin embargo, los datos obtenidos con modelos animales pueden no ser comparables a los obtenidos en modelos humanos, ya que se ha descrito en ratones, que la expresión de PPAR γ disminuye con la edad (Sung y col.

2004; Ye y col. 2006), al contrario de lo que se ha reportado en humanos. Por lo tanto, los resultados sobre PPAR γ obtenidos en estos animales pueden servir de modelo, pero no necesariamente pueden ser extrapolados a lo que puede ocurrir *in vitro* o *in vivo* en células humanas.

Respecto a *c/ebp α* , otro de los factores de transcripción que presenta un rol importante en la adipogénesis, se ha establecido que ejerce su actividad en presencia de PPAR γ activo, y que ambos factores de transcripción se regulan mutuamente (Rosen y MacDougald, 2006). Por lo tanto, se espera que ambos factores de transcripción presenten perfiles de expresión temporales similares y, en efecto, en este trabajo se observa un perfil de expresión similar para ambos transcritos, como también ha sido observado por otros autores (Sekiya y col. 2004; Tang y col. 2004).

Por otra parte, es destacable señalar que no existen en la literatura reportes sobre expresión génica en la vía adipogénica en MSCs obtenidas de donantes postmenopáusicas osteoporóticas. En este sentido, en este trabajo observamos expresión de cuatro marcadores (*ppar γ* , *c/ebp α* , *ap2* y *adipsina*) en todas las condiciones estudiadas, lo que, en conjunto con el depósito de lípidos evidenciado mediante tinción con Oil Red, confirma, que las MSCs de donantes postmenopáusicas efectivamente se diferencian hacia la vía adipogénica. Respecto a los niveles de abundancia de los transcritos evaluados, cabe señalar, en primer lugar, que los resultados presentados en esta tesis, relacionados con el análisis de la abundancia de los transcritos evaluados, es preliminar y es necesario ampliar este análisis a un mayor número de muestras, para lo cual experimentos de PCR en tiempo real (Q-PCR) están siendo desarrollados en nuestro laboratorio. En segundo lugar, existen consideraciones que impiden concluir si el aumento de la respuesta frente al estímulo adipogénico que

presentan las O-MSCs se debe reflejar necesariamente a nivel de expresión génica. Por ejemplo, se ha reportado que *ap2* es un gen blanco de PPAR γ , aunque también es blanco de otras vías (Makowski y col. 2005), por lo cual evaluar los niveles de *ap2* como una respuesta directa de la actividad de *ppar γ* o de la actividad adipogénica general puede ser inexacto. Adicionalmente, es posible que en las MSCs existan mecanismos de regulación post-transcripcionales, que jueguen un rol importante en la regulación de la diferenciación adipogénica, los cuales permitan incrementar o disminuir la respuesta de estas células frente a un estímulo adipogénico sin necesidad de aumentar la abundancia de diversos transcritos, aunque esta hipótesis necesita ser evaluada de manera experimental.

En resumen, el análisis de abundancia relativa de marcadores adipogénicos nos permite confirmar que la diferenciación de las MSCs hacia este linaje se refleja en cambios en la expresión de estos genes. Además, la presencia de *ap2* puede sugerir activación de PPAR γ . Proyecciones futuras de esta línea de análisis deben contemplar la realización de PCR en tiempo real para abordar cuantitativamente la adipogénesis a nivel transcripcional.

2. Expresión de la proteína PPAR γ y cambios en su nivel de fosforilación

Si bien el incremento en el potencial adipogénico de las MSCs de donantes osteoporóticas no se reflejó en cambios significativos en la abundancia de transcritos específicos de genes asociados a la diferenciación adipogénica, sí se observan diferencias importantes a nivel de PPAR γ . Estas diferencias a nivel de la proteína fueron observadas mediante western blot e inmunofluorescencia, sugiriendo que existen alteraciones a nivel post-transcripcional en las O-MSCs.

En primer lugar, es interesante hacer notar la mayor abundancia de PPAR γ en las O-MSCs en condiciones basales, en comparación a lo observado en las C-MSCs. No se ha reportado con anterioridad que MSCs de mujeres osteoporóticas presenten niveles elevados de PPAR γ al compararlas con células de donantes sanas. Los resultados obtenidos en este trabajo no permiten resolver si existe un estímulo, en las O-MSCs, que actúa directamente sobre PPAR γ , o bien si existen cambios río arriba de este factor de transcripción que inducen su aumento. En este trabajo, el perfil de expresión de PPAR γ observado en las C-MSCs muestra que la abundancia de este factor de transcripción aumenta, en tiempos tempranos, y luego disminuye hacia los 15 días de diferenciación, sugiriendo que la expresión de PPAR γ antecede al depósito de gotas de grasa, cambio morfológico asociado a la diferenciación adipogénica terminal. Cabe señalar que, si bien el aumento en la abundancia de PPAR γ es estadísticamente significativo sólo a los 3 días de diferenciación, dicha tendencia se observa también a los 5 días de diferenciación, luego de lo cual PPAR γ tiende a disminuir. Teniendo en cuenta estas consideraciones, se puede sugerir que existe la posibilidad de que alguna señal induzca la expresión basal de PPAR γ , la cual puede influir en el compromiso de la MSC hacia el linaje adipogénico.

Otro resultado de interés proviene del análisis temporal de la expresión de PPAR γ . El período comprendido entre los 3 y 7 días de diferenciación parece ser crucial para el rol que PPAR γ pueda tener en la diferenciación adipogénica, ya que en este período no sólo se producen cambios en los niveles de PPAR γ , sino que también se producen cambios importantes en los niveles de su forma inactiva, p-PPAR γ . Como se señaló en la introducción, existe bastante claridad respecto al rol inhibitorio que tiene la fosforilación del residuo de serina 84/112 sobre la actividad de PPAR γ (Hu y

col. 1996; Adams y col. 1997; Diradourian y col. 2005). Entre los 3 y 7 días de diferenciación adipogénica, en las C-MSCs se observa una disminución de p-PPAR γ (diferencia que es significativa a los 3 días de diferenciación; dicha tendencia se mantiene, aunque no significativamente, a los 5 y 7 días de diferenciación). Por lo tanto, esta "ventana temporal" podría estar asociada con un período de actividad de este factor de transcripción. Apoyando esta teoría, la expresión del transcrito del gen *ob*, codificante para leptina, se encuentra en niveles moderados en este período de tiempo, luego de lo cual aumenta. Considerando la evidencia que demuestra que la activación de PPAR γ inhibe la expresión de leptina (Kallen y Lazar, 1996; De Vos y col. 1996; Sinha y col. 1999; Hollenberg y col. 1997), es esperable que una vez que la célula ha traspasado esta ventana temporal de actividad de PPAR γ , aumente la abundancia relativa del gen *ob*, tal como se observa en los resultados preliminares presentados en este trabajo.

En conjunto, los resultados obtenidos por inmunofluorescencia y Western blot demuestran que el perfil de expresión de PPAR γ durante la diferenciación adipogénica es diferente en las MSCs obtenidas de donantes sanas de aquellas células obtenidas de donantes osteoporóticas. En las O-MSCs, los niveles elevados de PPAR γ , y la ausencia de cambios importantes en los niveles de la forma fosforilada, determinan una razón elevada y constante de PPAR γ activo (p-PPAR γ /PPAR γ), comparado con las C-MSCs, en las cuales esta razón tiende a disminuir durante tiempos tempranos de diferenciación. Las evidencias reportadas que demuestran la esencialidad de PPAR γ para la diferenciación adipogénica sugieren que cualquier cambio a nivel de la actividad de este factor de transcripción (o alteraciones en la abundancia de PPAR γ activo) puede tener un efecto importante sobre el curso de la diferenciación. Apoyando

esta hipótesis, se ha descrito muy recientemente que la célula troncal se compromete hacia el linaje osteogénico mediante la inhibición de PPAR γ , mediada por la vía Wnt no canónica (Takada y col. 2007a, 2007b). Aunque uno de los objetivos iniciales de esta Memoria de Tesis fue evaluar la actividad de PPAR γ , no fue posible realizar este experimento, pese a diversos intentos, por lo cual aún no es posible afirmar con certeza en qué grado los cambios observados en este trabajo influyen a nivel de la actividad de PPAR γ , siendo uno de los principales experimentos pendientes de este trabajo, y es un punto interesante de resolver en el futuro.

3. Efecto de leptina sobre PPAR γ

Los primeros reportes relativos al efecto de leptina sobre la adipogénesis sugerían que esta hormona, secretada principalmente por los adipocitos, tendría un rol antiosteogénico a nivel hipotalámico (Harada y Rodan, 2003; Ducy y col. 2000a; Ducy y col. 2000b). Como se señaló anteriormente, se ha reportado que la inyección intracerebroventricular de leptina en ratones *knock-out ob-/-* tiene un efecto antiosteogénico, disminuyendo la densidad mineral ósea (Ducy y col. 2000a). Por lo tanto, durante algún tiempo se adjudicó a leptina un rol como regulador negativo sobre la masa ósea, visión que persiste actualmente. Sin embargo, diversos reportes han demostrado que leptina, además de su rol a nivel del sistema nervioso, presenta efectos a nivel local en diversos tipos celulares. Específicamente, en nuestro laboratorio se ha demostrado la existencia de receptores de leptina de alta afinidad en las MSCs de donantes sanas y osteoporóticas (Hess y col. 2005), apoyando la idea de un rol de leptina a nivel local. Los trabajos de Thomas (Thomas y col. 1999) y Reseland (Reseland y col. 2001) finalmente demostraron que leptina puede ejercer una función

local pro-osteogénica, apoyando la teoría de que leptina podría ser el mediador del efecto protector del sobrepeso frente al desarrollo de la osteoporosis. Sin embargo, existen pocos reportes sobre el efecto de leptina sobre PPAR γ , y ninguno acerca del efecto de leptina sobre la fosforilación de este factor de transcripción.

En este sentido, los resultados obtenidos en este trabajo son de gran interés, puesto que sugieren que leptina puede regular negativamente a PPAR γ a dos niveles: disminuyendo su abundancia a nivel de proteína, y aumentando su fosforilación, especialmente en tiempos tempranos de diferenciación (siendo el día 3 en el cual se observó diferencias significativas). Estas observaciones se complementan con resultados publicados por otros autores, que demuestran una relación entre PPAR γ y leptina, a distintos niveles. Un trabajo reciente demuestra que leptina puede tener un rol inhibitorio sobre PPAR γ en MSCs humanas (Chang y col. 2006), tanto a nivel de expresión como de actividad. Además, se ha reportado que el tratamiento de la línea celular preadipocítica 3T3-L1 con la tiazolidinediona BRL49653 (familia de ligandos de PPAR γ), produce una marcada reducción de la expresión del gen *ob* (Kallen y Lazar, 1996), efecto similar al producido por otras tiazolidinedionas, como CP86325, Troglitazona y Pioglitazona. Otros autores también observaron el mismo efecto de BRL49653 sobre la expresión de leptina en cultivos de adipocitos obtenidos de rata (De Vos y col. 1996). El efecto de BRL49653 es mediado específicamente por PPAR γ , puesto que estos mismos autores demostraron que es necesaria la cotransfección de PPAR γ en la línea celular 3T3-L1 carente de PPAR γ endógeno, para replicar el efecto de BRL49653 sobre la expresión de leptina. Más aún, estos autores demuestran que la actividad del promotor del gen *ob* es regulado específicamente por PPAR γ en adipocitos de rata. Además, un ligando endógeno putativo de PPAR γ , 15-deoxi-

$\Delta^{12,14}$ Prostaglandina J2, también induce una disminución de la expresión del gen *ob*, mientras que no modificó la expresión del marcador adipogénico GLUT4, en la línea celular 3T3-L1 (Sinha y col. 1999), aportando evidencia sobre la posible regulación de PPAR γ sobre el gen *ob*.

De manera complementaria, se ha estudiado el promotor del gen *ob*, y se ha descrito que presenta un sitio de unión para el dímero PPAR γ /RXR, y otro sitio de unión para C/EBP α , proximal al sitio de inicio de la transcripción, evidencia que se complementa con experimentos que demuestran que C/EBP α presenta un rol activador de la actividad de este promotor, la cual se ve disminuida en presencia de PPAR γ 2 (Hollenberg y col. 1997). Por lo tanto, se puede sugerir que PPAR γ inhibe la expresión del gen *ob* compitiendo con factores activadores, como C/EBP α .

Aunque esta evidencia no explica la regulación negativa de leptina sobre PPAR γ , demuestra al menos que puede existir una relación entre ambas proteínas. Considerando que en los resultados preliminares de RT-PCR presentados en este trabajo se observó un aumento en la abundancia del transcrito de leptina a partir del día 5 en las C-MSCs, período en el cual la abundancia de PPAR γ ya no está estadísticamente aumentada respecto al valor basal, entonces es posible que leptina quede "liberado" del estímulo inhibitorio mediado por PPAR γ cuando este factor de transcripción disminuya su abundancia en la célula. Es probable que leptina pueda inducir la expresión de otros genes que codifiquen proteínas que inhiban a PPAR γ , generándose de esta manera un ciclo de regulación entre PPAR γ y leptina. Además, la propia síntesis de leptina por parte de las MSCs, en conjunto con los elevados niveles observados en la médula ósea, active vías de transducción de señales que inhiban la expresión de PPAR γ e induzcan su fosforilación. En este sentido, es de interés evaluar

qué rutas de señalización podrían mediar este efecto de leptina sobre PPAR γ , en especial la vía MEK/ERK, la cual ha sido estudiada por nuestro grupo de trabajo en las MSCs de donantes postmenopáusicas, observándose un nivel de fosforilación de ERK 2,5 veces mayor en las O-MSCs, comparado con las C-MSC en la condición basal (Rodríguez y col. 2004).

Finalmente, otro posible mecanismo por el cual leptina pueda regular negativamente a PPAR γ es mediante la inducción de proteínas pro-osteogénicas, incluyendo a Runx2, y que éstas proteínas, a su vez, regulen negativamente a PPAR γ . Existe evidencia que muestra que leptina es capaz de inducir la expresión de Runx2 (Chang y col. 2006), aunque no queda claro si esta inducción es mediada por una disminución previa de PPAR γ . Un experimento interesante es la medición de los niveles de Runx2 en células o animales *knock-out* para *ppary* y, recíprocamente, la medición de los niveles de PPAR γ en células deficientes de *runx2*, para determinar si alguno de estos factores está involucrado en su respuesta a leptina. Experimentos previos de nuestro grupo de trabajo muestran que leptina induce un aumento de los niveles de Runx2, evaluados mediante Western Blot, reafirmando la idea de una posible regulación positiva de leptina sobre proteínas pro-osteogénicas.

En resumen, existen al menos tres posibles mecanismos por los cuales leptina podría regular negativamente a PPAR γ : interacción directa con este factor de transcripción (probablemente a nivel citoplasmático, promoviendo su degradación), ejerciendo su actividad a través de vías de transducción de señales, y/o mediante la inducción de genes pro-osteogénicos. Una de las principales proyecciones de este trabajo se relaciona, por ende, con el estudio de estos posibles mecanismos, y de cómo operarían en las MSCs de mujeres sanas y osteoporóticas.

4. Disponibilidad de leptina en la médula ósea

Existen dos aspectos de los resultados obtenidos respecto a los niveles de leptina en la médula ósea que merecen ser destacados. El primero está relacionado con los niveles de leptina y de su receptor soluble. En este trabajo se propone que la razón entre Ob/sR-Ob puede ser importante para determinar la disponibilidad de leptina en el microambiente de la médula ósea. Se ha reportado que la forma soluble regula a leptina, al menos a dos niveles. En el primer caso, recientemente se ha descrito que el receptor soluble inhibe el transporte de leptina a través de la barrera hematoencefálica, pero se propone que este fenómeno podría ocurrir en otros sistemas (Tu y col. 2008). En segundo lugar, existe evidencia que sugiere que la unión de leptina a su receptor soluble inhibiría la unión de leptina a sus receptores Ob-R en la membrana plasmática, limitando su acción (Zastrow y col. 2003). Adicionalmente, se ha demostrado que la forma soluble del receptor puede regular la señalización de leptina, secuestrando a leptina e impidiendo que ejerza su acción (Yang y col. 2004).

En este trabajo, para la medición de leptina se descartaron las donantes con obesidad, y el IMC entre ambos grupos no presentó diferencias significativas, por lo que la disparidad en los niveles de leptina refleja alguna característica propia de las donantes. Considerando estos antecedentes, es importante analizar la razón entre leptina y su receptor soluble (Ob/sR-Ob), ya que podría ser un indicador de la fracción de leptina disponible que podría ejercer su efecto sobre las MSCs. La razón Ob/sR-Ob es tres veces mayor en la médula ósea de donantes controles, comparado a la médula ósea de donantes osteoporóticas. Estos resultados sugieren que sería de interés determinar la producción local de leptina en diferentes tejidos (para determinar si podría ocurrir una expresión diferencial de leptina en células residentes en otros tejidos o si las diferencias en los niveles de leptina se reflejan de manera sistémica), o la

secreción de leptina en los cultivos de MSCs, en ambos grupos de donantes. En este trabajo, se intentó medir los niveles de leptina en los medios condicionados de las MSCs, aunque sin éxito, pues existen variables que interfieren con la medición (baja cantidad de leptina, lo que hace necesario liofilizar y concentrar la muestra; posible interferencia del suero, entre otras). Sin embargo, la medición de leptina (y su receptor soluble) en la médula ósea entrega una información valiosa en cuanto demuestra que existen diferencias entre mujeres sanas y osteoporóticas no sólo a nivel celular, sino que también a nivel sistémico. Evidentemente, existen algunos aspectos técnicos que deben considerarse en este análisis. En primer lugar, no se puede descartar que existan otras proteínas que también se unan a leptina, disminuyendo su disponibilidad en la médula ósea. Es posible que en la médula ósea de donantes osteoporóticas la disponibilidad de leptina sea distinta a la de las donantes sanas en virtud no sólo de la razón entre leptina y su receptor soluble, sino además debido a diferencias en los niveles de otras proteínas. En segundo lugar, el producto comercial utilizado para determinar los niveles de leptina en este trabajo, no indica si mide la leptina total en el suero o la leptina que no se encuentre unida a otras proteínas. No obstante estas consideraciones, los resultados presentados sugieren de manera importante que pueden existir diferencias en la cantidad de leptina circulante en la médula ósea entre donantes sanas y osteoporóticas.

El segundo aspecto que vale destacar es la similitud entre los niveles de leptina en el plasma de la médula ósea y el de sangre periférica. No se han reportado mediciones de leptina en la médula ósea, probablemente debido al grado de complejidad que implica obtener una muestra. Sin embargo, las mediciones realizadas en este trabajo sugieren que los niveles de leptina en el plasma obtenido de muestras

de sangre periférica son una muy buena aproximación para comparar mujeres sanas versus osteoporóticas.

Respecto de los reportes previos sobre los niveles de leptina en la literatura, nuestros datos son comparables a los publicados recientemente. Dos trabajos reportan niveles de leptina para mujeres osteoporóticas de 14,98 ng/ml (Shaarawy y col. 2003) y 8,0 ng/ml (Yamauchi y col. 2001), versus los 7,3 ng/ml observados en nuestra medición. Las diferencias entre uno y otro estudio pueden ser explicadas por varios factores: diferencias a nivel de la dieta de las pacientes estudiadas, diferencias asociadas a la región de estudio, posibles polimorfismos genéticos característicos de cada población o diferencias en el índice de masa corporal del grupo estudiado, entre otras. Por ejemplo, un estudio reportó niveles de leptina de 18,7 ng/ml para mujeres sanas y de 22,4 ng/ml para mujeres osteoporóticas (Odabasi y col. 2000). Sin embargo, el IMC promedio para cada grupo fue de 28,9 Kg/m² y 29,5 Kg/m² para el grupo control y el osteoporótico, respectivamente. Ambos valores de IMC, correspondientes a la categoría de "sobrepeso", son mayores que los observados para nuestro grupo de pacientes seleccionadas, más cercanos a la categoría "normal". Además, ambos valores de leptina son similares en el estudio de Odabasi, lo cual puede explicarse por la mínima diferencia de densidad mineral ósea entre ambos grupos (0,7 g/cm² en el grupo control versus 1 g/cm² en el grupo osteoporótico).

En resumen, el nivel de leptina en plasma es un indicador adicional que refleja diferencias entre mujeres sanas y osteoporóticas. Es de interés seguir profundizando en estas diferencias; aún no existe claridad sobre si éstas se deben a variaciones en la síntesis local de leptina o variaciones a nivel sistémico o periférico. Tampoco existe certeza sobre si la diferencia en los niveles plasmáticos de leptina podría tener un rol en un posible efecto protector del sobrepeso frente a la osteoporosis. La creciente

evidencia que muestra que la administración de leptina en ratones deficientes del gen *ob* induce un aumento en la masa ósea (Hamrick y col. 2005) sugiere que es probable que los niveles plasmáticos de leptina puedan tener un efecto a nivel del metabolismo óseo, aunque no existe claridad sobre los mecanismos que puedan mediar este efecto.

5. Propuesta de un modelo de regulación de leptina sobre la adipogénesis

Con el fin de integrar los resultados obtenidos en este trabajo, es posible proponer un modelo general por el cual leptina pueda regular positivamente el metabolismo óseo. La Tabla 3 resume las diferencias observadas (ya sea diferencias significativas como tendencias observadas) en este trabajo, entre donantes sanas y osteoporóticas.

Característica	Donante Sana	Donante Osteoporótica
Expresión de PPAR γ	Aumento entre los 3-7 días de diferenciación (significativa a los 3 días)	Elevada y constante durante la diferenciación
Fosforilación de PPAR γ	Disminución entre los 3-7 días de diferenciación (significativa a los 3 días)	Elevada y constante durante la diferenciación
Efecto de leptina sobre PPAR γ	Tendencia hacia una disminución de PPAR γ	No tiene efecto
Efecto de leptina sobre fosforilación de PPAR γ	Revierde disminución observada entre los 3-7 días (significativa a los 3 días)	No tiene efecto
Abundancia del gen <i>ob</i> (preliminares)	Transcrito comienza a observarse a los 3 días de diferenciación	Transcrito comienza a observarse a los 5 días de diferenciación
Nivel de leptina en plasma	Altos niveles	Bajos niveles

Tabla 3. Resumen de características diferenciales entre las donantes sanas y osteoporóticas, o entre las MSCs obtenidas desde cada tipo de donante. Para los detalles, véase la sección "Resultados".

Considerando estos resultados, se puede proponer el siguiente mecanismo general. En mujeres sanas, la célula troncal mesenquimática puede diferenciarse hacia el linaje osteogénico o el adipogénico, dependiendo de las señales disponibles en el

microambiente de la médula ósea. La alta disponibilidad de leptina presente en la médula ósea de estas mujeres puede ser un factor que contribuya, mediante la disminución de la abundancia de PPAR γ y un aumento en su fosforilación, a inhibir el proceso adipogénico, promoviendo el compromiso de la MSC hacia el linaje osteogénico, en donde esta célula expresa Runx2 y marcadores osteogénicos como sialoproteína del hueso, colágeno tipo I y osteocalcina (resultados no publicados de nuestro laboratorio, y presentados en parte en la tesis de pregrado de P. Astudillo, 2007). Adicionalmente, la disponibilidad de leptina local puede inducir un aumento en la transcripción del gen *ob*, generando un ciclo de regulación positivo de la expresión y actividad de esta hormona (Figura 17). En este punto en particular, si bien no existen antecedentes de la literatura para proponer que leptina pueda regular positivamente su propia expresión, se puede proponer como una hipótesis de interés a estudiar. En última instancia, ya que se ha descrito que PPAR γ puede inhibir la expresión de leptina, como se discutió anteriormente, se puede sugerir que, si la suplementación del medio de cultivo adipogénico con leptina, induce una disminución de PPAR γ y un aumento en su nivel de fosforilación, entonces al haber una fracción menor de PPAR γ inactivo, se podría liberar al gen *ob* de la regulación negativa ejercida por PPAR γ , favoreciendo su expresión.

Por otra parte, en el microambiente de la médula ósea de mujeres osteoporóticas, estarían predominando señales que estimulen el compromiso de las MSCs hacia el linaje adipogénico. Una de las señales que puede contribuir a esta decisión es la baja disponibilidad de leptina. Estas mismas señales que estarían favoreciendo el compromiso de la MSC hacia la vía adipogénica, inducen un aumento en la abundancia de PPAR γ (observados de manera significativa a los 3 días de

diferenciación, en esta tesis), o bien en la expresión de factores más tempranos que inducen, subsecuentemente, la expresión de PPAR γ . La observación de los niveles elevados de PPAR γ en condiciones basales en las MSCs de donantes osteoporóticas (en comparación a las de donantes sanas) sugiere que la inducción de PPAR γ puede ser directa y no como respuesta a factores río arriba previos a este factor de transcripción. Adicionalmente, la fosforilación inducida por leptina observada en las C-MSCs, estaría ausente en las O-MSCs, favoreciendo la actividad de PPAR γ y, por ende, favoreciendo la adipogénesis (Figura 18).

Evidentemente, se requiere de una serie de experimentos para comprobar este posible modelo de regulación del metabolismo óseo, el cual no necesariamente explica completamente las diferencias observadas entre C-MSCs y O-MSCs, pero que contribuye a comprender la diferencia en el compromiso de las MSCs hacia el linaje osteogénico o adipogénico. Aunque queda por resolver algunos puntos importantes, como por ejemplo, si existen alteraciones a nivel de la actividad de PPAR γ , existe una serie de eventos "tempranos" dentro del curso de la diferenciación adipogénica (a nivel de PPAR γ , específicamente), y más "tardíos" (aumento en la adipogénesis evidenciada mediante el depósito de gotas de lípidos) que apoyan el modelo planteado. Resta evaluar otros componentes de la ruta adipogénica, como los miembros de la familia de los C/EBPs, que puedan ilustrar de manera más completa este proceso de diferenciación en MSCs de donantes controles y osteoporóticas.

Además, es necesario establecer la conexión entre leptina y PPAR γ , ya sea a nivel de las vías de transducción de señales implicadas en la señalización de leptina, y a nivel de interacciones directas entre leptina y PPAR γ ; por ejemplo, evaluando si leptina puede regular transcripcional o traduccionalmente a PPAR γ .

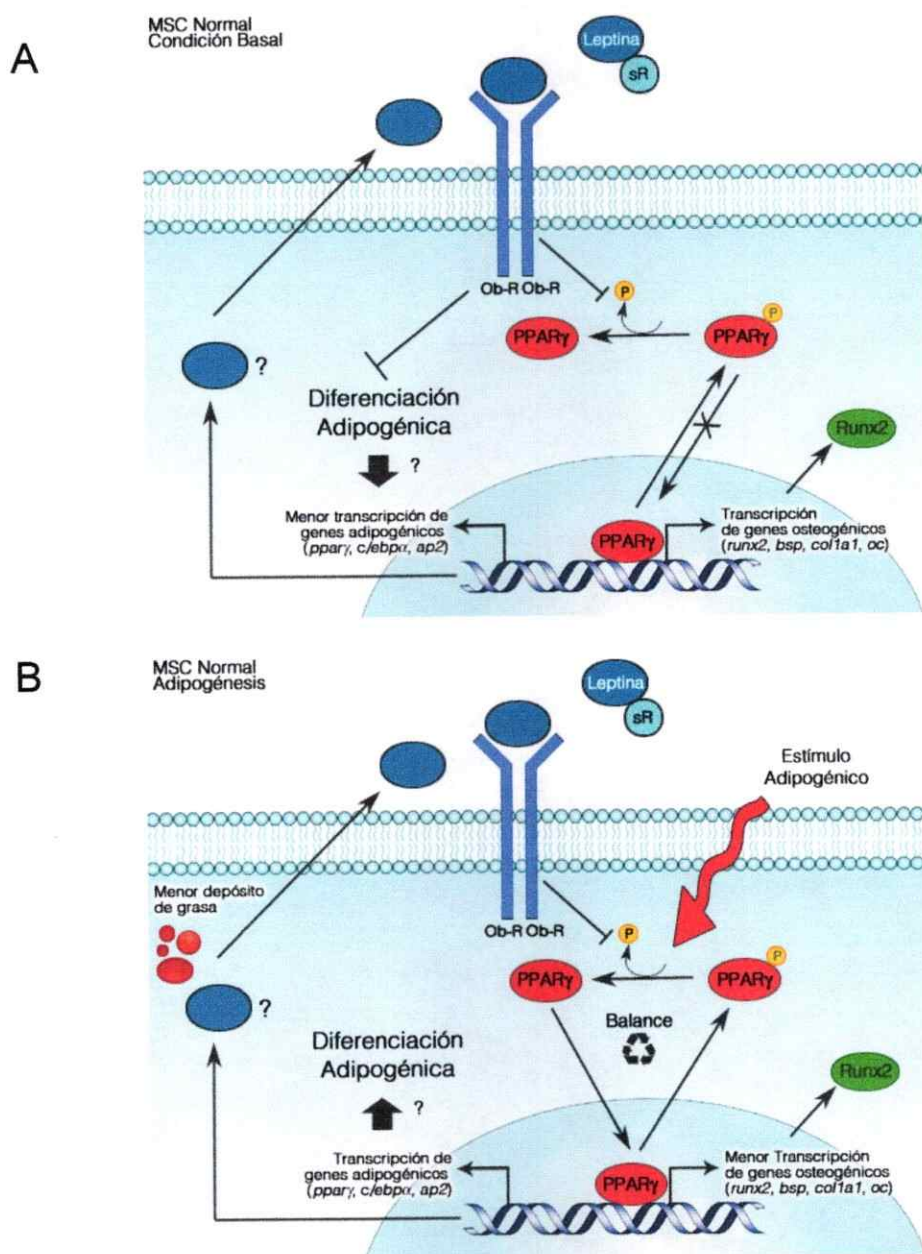


Figura 17. Regulación de la adipogénesis en C-MSCs. (A) En la condición basal, la leptina biodisponible (no unida a su receptor soluble, sR) en la médula ósea puede inhibir la desfosforilación de PPAR γ , manteniendo inactivo a este factor de transcripción, lo que unido a los bajos niveles observados en estas células, determinaría una adipogénesis reducida. (B) En presencia de estímulos adipogénicos, coexiste la regulación negativa ejercida por leptina junto a la regulación positiva producida por una inducción de un aumento en los niveles de PPAR γ . Esto determina un aumento en la adipogénesis, lo que se refleja en el depósito de gotas de grasa. En ambos casos, existe expresión del factor de transcripción osteogénico Runx2 (el cual puede ejercer funciones no señaladas en la figura) y una posible expresión local de leptina.

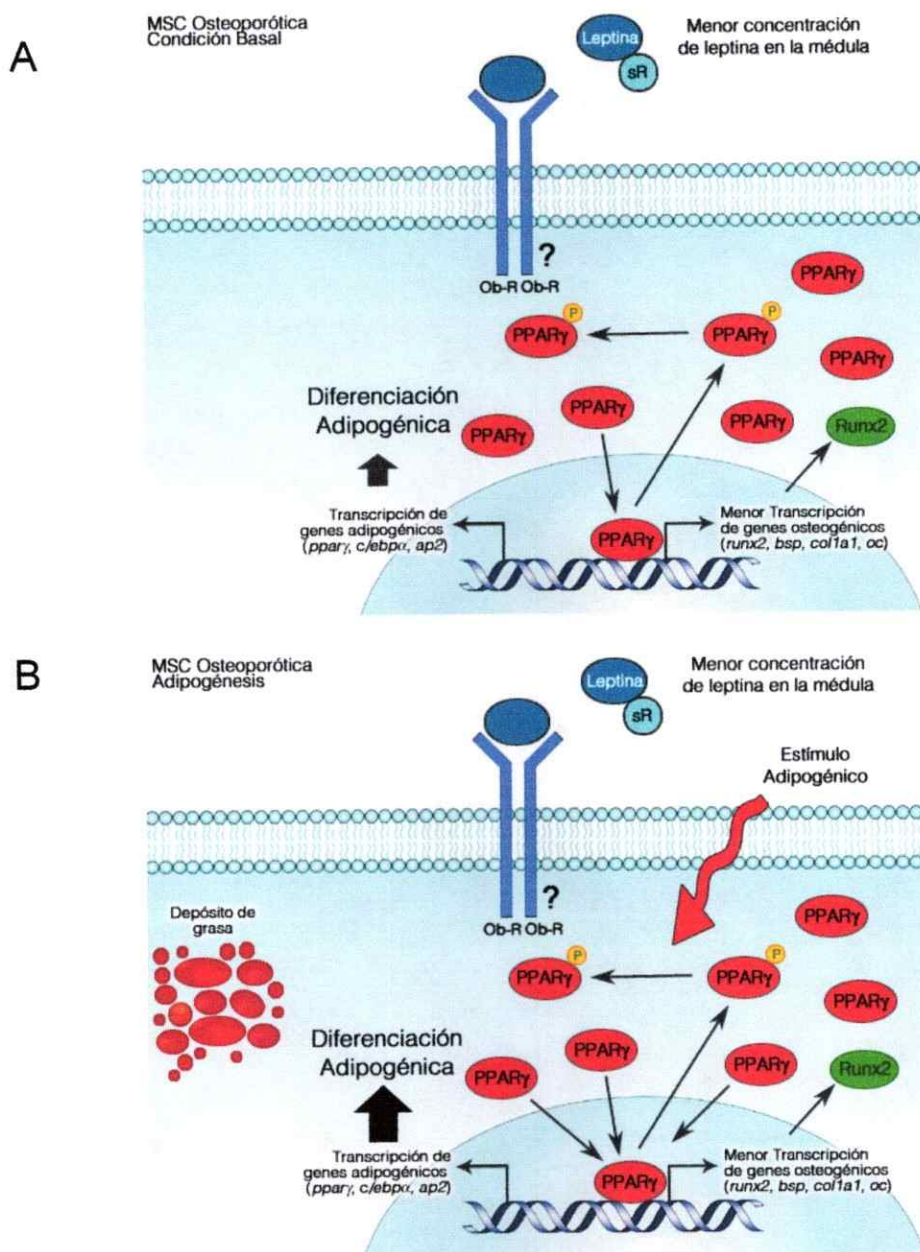


Figura 18. Regulación de la adipogénesis en O-MSCs. (A) En condiciones basales, existen señales que inducen la expresión de PPAR γ en niveles elevados. Puesto que no se observan cambios en los niveles de p-PPAR γ , la elevada cantidad de PPAR γ total determina un aumento de la capacidad de diferenciación adipogénica. Los menores niveles circulantes de leptina pueden jugar un papel importante, pues las O-MSCs se liberarían de la regulación negativa que leptina ejerce sobre PPAR γ . (B) En presencia de un estímulo adipogénico, no se observan cambios a nivel de PPAR γ ; sin embargo, al existir altos niveles de este factor de transcripción, el aumento en la capacidad de diferenciación adipogénica se traduce, finalmente, en la expresión de marcadores de diferenciación adipogénica y en el depósito de grasa característico.

En resumen, en este trabajo se ha observado una serie de diferencias entre donantes sanas y osteoporóticas². Estas evidencias concuerdan con la teoría lipídica de la osteoporosis, mencionada previamente, y los efectos de leptina observados en las donantes sanas sustentan un papel protector de leptina sobre el metabolismo óseo.

² Cabe destacar que un conjunto de los resultados presentes en este trabajo, forman parte de una publicación recientemente aceptada: Astudillo P., Ríos S., Pastenes L., Pino A.M., Rodríguez J.P. Increased adipogenesis of osteoporotic human-mesenchymal stem cells (MSCs) characterizes by impaired leptin action. *J. Cell. Biochem.* 2008, 103:1054-1065.

CONCLUSIONES

1. Las células troncales mesenquimáticas (MSCs) aisladas de mujeres postmenopáusicas osteoporóticas y de mujeres sanas presentan diferencias a nivel de la abundancia y fosforilación de PPAR γ y a nivel de la abundancia de leptina en la médula ósea, que pueden apoyar la teoría lipídica de la osteoporosis.
2. El factor de transcripción adipogénico PPAR γ se encuentra en niveles elevados en MSCs de donantes osteoporóticas; esto, junto a su perfil de fosforilación, puede contribuir al aumento en la adipogénesis observado en estas células.
3. El efecto negativo descrito que leptina ejerce sobre la adipogénesis sólo en MSCs de donantes sanas, se podría explicar por una tendencia hacia una disminución de la abundancia de PPAR γ , y un aumento en la abundancia de PPAR γ fosforilado. Esto apoya la hipótesis de que el nivel elevado de leptina asociado al sobrepeso puede ejercer un efecto protector sobre el tejido óseo.
4. La mayor disponibilidad de leptina en la médula ósea de donantes sanas, junto a la regulación negativa de leptina sobre la adipogénesis en las C-MSCs, puede contribuir a favorecer un recambio óseo que permita la mantención de una adecuada estructura y funcionalidad del hueso.

BIBLIOGRAFIA

- Abdallah, B.M., Haack-Sørensen, M., Fink, T. y Kassem, M. 2006. Inhibition of osteoblast differentiation but not adipocyte differentiation of mesenchymal stem cells by sera obtained from aged females. *Bone*. 39: 181-188.
2. Abramoff, M.D., Magelhaes, P.J., Ram, S.J. 2004. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*. 11: 36-42.
- Adams, M., Reginato, M., Shao, D., Lazar, M.A. y Chatterjee, V.K. 1997. Transcriptional Activation by Peroxisome Proliferator-activated receptor γ is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated Protein Kinase Site. *J. Biol. Chem.* 272: 5128-5132.
- Ahdjoudj, S., Kaabeche, K., Holy, X., Fromigue, O., Modrowski, D., Zerath, E. y Marie, P.J. 2005. Transforming growth factor-beta inhibits CCAAT/enhancer-binding protein expression and PPAR γ activity in unloaded bone marrow stromal cells. *Exp. Cell Res.* 303: 138-147.
- American College of Obstetricians and Gynecologists. 2004. Osteoporosis. *Obstet. Gynecol.* 104: 66S-76S.
- Akune, T., Ohba, S., Kamekura, S., Yamaguchi, M., Chung, U., Kubota, N., Terauchi, Y., Harada, Y., Azuma, Y., Nakamura, K., Kadowaki, T. y Kawaguchi, H. 2004. PPAR γ insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *J. Clin. Invest.* 113: 846-855.
- Borah, B., Ritman, E.L., Dufresne, T.E., Jorgensen, S.M., Liu, S., Sacha, J., Phipps, R.J. y Turner, R.T. 2005. The effect of risedronate on bone mineralization as measured by micro-computed tomography with synchrotron radiation: correlation to histomorphometric indices of turnover. *Bone*. 37: 1-9.
- Barak, Y., Nelson, M.C., Ong, E.S., Jones, Y.Z., Ruiz-Lozano, P., Chien, K.R., Koder, A. y Evans, R.M. 1999. PPAR γ is required for placental, cardiac and adipose tissue development. *Mol. Cell.* 4: 585-595.
- Canalis, E., Economides, A. y Gazzero, E. 2003. Bone Morphogenetic Proteins, their antagonists, and the Skeleton. *Endocrine Reviews*. 24: 218-235.
- Celil, A.B., Hollinger, J.O. y Campbell, P.G. 2005. Osx transcriptional regulation is mediated by additional pathways to BMP2/Smad signaling. *J. Cell. Biochem.* 95: 518-528.

- Chang, Y., Shih, D.T., Tseng, C., Hsieh, T., Lee, D. y Hwang, S. 2006. Disparate Mesenchyme-lineage tendencies in mesenchymal stem cells from human bone marrow and umbilical cell blood. *Stem Cells*. 24: 679-685.
- Chesnut III, C.H., Skag, A., Christiansen, C., Recker, R., Syakkestad, J.A., Hoiseth, A., Felsenberg, D., Huss, H., Gilbride, J., Schimmer, R.C. y Delmas, P.D. 2004. Effects of oral ibandronate administered daily or intermittently on fracture risk in postmenopausal osteoporosis. *J. Bone Min. Res.* 19: 1241-1249.
- Compston, J. 2002. Local biosynthesis of sex steroids in bone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87: 5398-5400.
- Cock, T.A. y Auwerx, J. 2003. Leptin: cutting the fat off the bone. *Lancet*. 362: 1572-1574.
- De Vos, P., Lefebvre, A.M., Miller, S.G., Guerre-Millo, M., Wong, K., Saladin, R., Hamann, L.G., Staels, B., Briggs, M.R. y Auwerx, J. 1996. Thiazolidinediones repress ob gene expression in rodents via activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J. Clin. Invest.* 98: 1004-1009.
- Diradourian, C., Girard, J. y Pégrier, J. 2005. Phosphorylation of PPARs: from molecular characterization to physiological relevance. *Biochimie*. 87: 33-38.
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A.L. y Karsenty, G. 1997. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*. 89: 747-754.
- Ducy, P; Amling, M., Takeda, S., Priemel, M., Schilling, A.F., Beil, F.T., Shen, J., Vinson, C., Rueger, J.M. y Karsenty, G. 2000. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell*. 100: 197-207.
- Ducy P., Schinke T. y Karsenty G. 2000b. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science*. 289: 1501-1504.
- Ebeling, P., Atley, L., Guthrie, J., Burger, H., Dennerstein, L., Hopper, J. y Wark, J. 1996. Bone Turnover Markers and Bone Density Across the Menopausal Transition. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81: 3366-3371.
- Epstein, S. y Zaidi, M. 2005. Biological properties and mechanism of action of ibandronate: application to the treatment of osteoporosis. *Bone*. 37: 433-440.
- Franceschi, R.T. y Xiao, G. 2003. Regulation of the Osteoblast-Specific Transcription factor, *Runx2*: responsiveness to Multiple Signal transduction pathways. *J. Cell. Biochem.* 88: 446-454.
- Geoffroy, V., Kneissel, M., Fournier, B., Boyde, A. y Matthias, P. 2002. High bone resorption in adult aging transgenic mice overexpressing *cbfa1/runx2* in cells of the osteoblastic lineage. *Mol. Cell. Biol.* 22: 6222-6233.

- Günther, T y Schüle, R. 2007. Fat or bone? A non-canonical decision. *Nat. Cell Biol.* 9: 1229-1231.
- Hamrick, M.W., Della-Fera, M.A., Choi, Y., Pennington, C., Hartzell, D. y Baile, C.A. 2005. Leptin treatment induces loss of bone marrow adipocytes and increases bone formation in leptin-deficient ob/ob mice. *J. Bone Miner. Res.* 20: 994-1001.
- Harada, S. y Rodan, G. 2003. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature.* 423: 349-355.
- Hegyí, K., Fülöp, K., Kovács, K., Tóth, S. y Falus, A. 2004. Leptin-induced signal transduction pathways. *Cell Biol. Int.* 28: 159-169.
- Hess, R., Pino, A.M., Ríos, S., Fernández, M. y Rodríguez, J.P. 2005. High affinity leptin receptors are present in human mesenchymal stem cells (MSCs) derived from control and osteoporotic donors. *J. Cell. Biochem.* 94: 50-57.
- Hollenberg, A.N., Susulic, V.S., Madura, J.P., Zhang, B., Moller, D.E., Tontonoz, P., Sarraf, P., Spiegelman, B.M. y Lowell, B.B. 1997. Functional antagonism between CCAAT/Enhancer binding protein- α and peroxisome proliferator-activated receptor- γ on the leptin promoter. *J. Biol. Chem.* 272: 5283-5290.
- Horowitz, M. 1993. Cytokines and estrogen in bone: anti-osteoporotic effects. *Science*, 260: 626-627.
- Hu, E., Kim, J.B., Sarraf, P. y Spiegelman, B.M. 1996. Inhibition of adipogenesis through MAP Kinase-mediated phosphorylation of PPAR γ . *Science.* 274: 2100-2103.
- Jaiswal, N., Haynesworth, S.E., Caplan, A.I. y Bruder, S.P. 1997. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J. Cell. Biochem.* 64: 295-312.
- Jeon, M.J., Kim, J.A., Kwon, S.H., Kim, S.W., Park, K.S., Park, S., Kim, S.Y. y Shin, C.S. 2003. Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ inhibits the Runx2-mediated transcription of osteocalcin in osteoblasts. *J. Biol. Chem.* 278: 23270-23277.
- Justesen, J., Pedersen, S.B., Stenderup, K. y Kassem, M. 2004. Subcutaneous adipocytes can differentiate into bone-forming cells in vitro and in vivo. *Tissue Eng.* 10: 381-391.
- Kallen, C.B. y Lazar, M.A. 1996. Antidiabetic thiazolidinediones inhibit leptin (ob) gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 5793-5796.
- Kang, S., Bennett, C.N., Gerin, I., Rapp, L.A., Hankenson, K.D. y Macdougald, O.A. 2007. Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein α and peroxisome proliferator-activated receptor γ . *J. Biol. Chem.* 282: 14515-14524.

Kawai, M., Mushiake, S., Bessho, K., Murakami, M., Namba, N., Kokubu, C., Michigami, T. y Ozono, K. 2007. Wnt/Lrp/beta-catenin signaling suppresses adipogenesis by inhibiting mutual activation of PPAR γ and C/EBP α . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 363: 276-282.

Khan, E. y Abu-Amer, Y. 2003. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ inhibits differentiation of preosteoblasts. *J. Lab. Clin. Med.* 142: 29-34.

Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R.T., Gao, Y., Inada, M., Sato, M., Okamoto, R., Kitamura, Y., Yoshiki, S. y Kishimoto, T. 1997. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrests of osteoblasts. *Cell.* 89: 755-764.

Komori, T. 2006. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J. Cell. Biochem.* 99: 1233-1239.

Kontogianni, M.D., Dafni, U.G., Routsias, J.G. y Skopouli, F.N. 2004. Blood Leptin and Adiponectin as Possible Mediators of the relation between fat mass and BMD in perimenopausal women. *J. Bone Miner. Res.* 19: 546-551.

Kota, B.P., Huang, T.H. y Roufogalis, B.D. 2005. An overview of biological mechanisms of PPARs. *Pharm. Res.* 51: 85-94.

Laharrague, P., Larrouy, D., Fontanilles, A.M., Truel, N., Campfield, A., Tenenbaum, R., Galitzky, J., Corberand, J.X., Pénicaud, L. y Casteilla, L. 1998. High expression of leptin by human bone marrow adipocytes in primary culture. *Faseb J.* 12: 747-752.

Lecka-Czernik, B., Gubrij, I., Moerman, E.J., Kajkenova, O., Lipschitz, D.A., Manolagas, S.C. y Jilka, R.L. 1999. Inhibition of *Osf2/Cbfa1* Expression and Terminal Osteoblast Differentiation by PPAR γ 2. *J. Cell. Biochem.* 74: 357-371.

Lee, C., Olson, P. y Evans, R.M. 2003. Minireview: Lipid Metabolism, Metabolic diseases, and Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Endocrinology.* 144: 2201-2207.

Lin, J.T. y Lane, J.M. 2004. Osteoporosis: a Review. *Clin. Orthop. Relat. R.* 425: 126-134.

Liu, W., Toyosawa, S., Furuichi, T., Kanatani, N., Yoshida, C., Liu, Y., Himeno, M., Narai, S., Yamaguchi, A. y Komori, T. 2001. Overexpression of *Cbfa1* in osteoblasts inhibits osteoblasts maturation and causes osteopenia with multiple fractures. *J. Cell. Biol.* 155: 157-166.

Lowell, B.B. 1999. PPAR γ : an essential regulator of adipogenesis and modulator of fat cell function. *Cell.* 99: 239-242.

Mackay, D., Tesar, P.J., Liang, L., Haynesworth, S.E. 2006. Characterizing medullary and human mesenchymal stem cell-derived adipocytes. *J. Cell. Physiol.* 207: 722-728.

Makowski, L., Brittingham, K.C., Reynolds, J.M., Suttles, J. y Hotamisligil, G.S. The fatty acid-binding protein, aP2, coordinates macrophage cholesterol trafficking and inflammatory activity. Macrophage expression of aP2 impacts peroxisome proliferator-activated receptor gamma and I κ B kinase activities. *J. Biol. Chem.* 280: 12888-12895.

Manolagas, S.C. y Jilka, R.L. 1995. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling: emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N. Engl. J. Med.* 332: 305-311.

Margetic, S., Gazzola, C., Pegg, G.G. y Hill, R.A. 2002. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 26: 1407-1433.

Mellström, D.D., Sörensen, O.H., Goemaere, S., Roux, C., Johnson, T.D. y Chines, A.A. 2004. Seven years of treatment with risedronate in women with postmenopausal osteoporosis. *Calcif. Tissue Int.* 75: 462-468.

Miyazono, K., Maeda, S. y Imamura, T. 2004. Coordinate regulation of cell growth and differentiation by TGF- β superfamily and Runx2 proteins. *Oncogene.* 23: 4232-4237.

Misso, M.L., Jang, C., Adams, J., Tran, J., Murata, Y., Bell, R., Boon, W.C., Simpson, E.R. y Davis, S.R. 2005. Differential expression of factors involved in fat metabolism with age and the menopause transition. *Maturitas.* 51: 299-306.

Moerman, E.J., Teng, K., Lipschitz, D.A. y Lecka-Czernik, B. 2004. Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: the role of PPAR- γ 2 transcription factor and TGF- β /BMP signaling pathways. *Aging Cell.* 3: 379-389.

Morales-Torres, J. y Gutiérrez-Ureña, S. 2004. The Burden of Osteoporosis in Latin America. *Osteoporos. Int.* 15: 625-632.

Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R. y de Crombrughe, B. 2002. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell.* 108: 17-29.

Neer, R., Arnaud, C., Zanchetta, J., Prince, R., Gaich, G., Reginster, J., Hodsmann, A., Eriksen, E., Ish-Shalom, S., Genant, H., Wang, O. y Mitlak, B. 2001. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N. Engl. J. Med.* 344: 1434-1441.

Nishimura, R., Hata, K., Harris, S.E., Ikeda, F. y Yoneda, T. 2002. Core-binding factor alpha 1 (Cbfa1) induces osteoblastic differentiation of C2C12 cells without interactions with Smad1 and Smad5. *Bone.* 31: 303-312.

- Nuttall, M.E., Patton, A.J., Olivera, D.L., Nadeau, D.P. y Gowen, M. 1998. Human Trabecular bone cells are able to express both osteoblastic and adipocytic phenotype: implications for osteopenic disorders. *J. Bone Miner. Res.* 13: 371-382.
- Nuttall, M.E. y Gimble, J.M. 2000. Is there a therapeutic opportunity to either prevent or treat osteopenic disorders by inhibiting marrow adipogenesis? *Bone.* 27: 177-184.
- Odabaşı, E., Ozata, M., Turan, M., Bingöl, N., Yöner, A., Cakir, B., Kutlu, M. y Ozdemir, I.C. 2000. Plasma leptin concentrations in postmenopausal women with osteoporosis. *Eur. J. Endocrinol.* 142: 170-173.
- Otto, F., Thornell, A.P., Crompton, T., Denzel, A., Gilmour, K., Rosewell, I., Stamp, G., Beddington, R., Mundlos, S., Olsen, B., Selby, P. y Owen, M.J. 1997. *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell.* 89: 765-771.
- Parhami, F., Jackson, S., Tintut, Y., Le, V., Balucan, J., Territo, M. y Demer, L. 1999. Atherogenic diet and minimally oxidized low density lipoprotein inhibit osteogenic and promote adipogenic differentiation of marrow stromal cells. *J. Bone Miner. Res.* 14: 2067-2078.
- Pino, A.M., Rodríguez, J.M., Ríos, S., Astudillo, P., Leiva, L., Seitz, G., Fernández, M. y Rodríguez, J.P. 2006. Aromatase activity of human mesenchymal stem cells is stimulated by early differentiation, vitamin D and leptin. *J. Endocrinol.* 191: 715-725.
- Raisz, L. 2005. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J. Clin. Invest.* 115: 3318-3325.
- Ramji, D.P. y Foka, P. 2002. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem. J.* 365: 561-575.
- Rangwala, S. y Lazar, M.A. 2000. Transcriptional Control of Adipogenesis. *Annu. Rev. Nutr.* 20: 535-559.
- Reginster, J.Y., Adami, S., Lakatos, P., Greenwald, M., Stepan, J.J., Silverman, S.L., Christiansen, C., Rowell, L., Mairon, N., Bonvoisin, B., Drezner, M.K., Emkey, R., Felsenberg, D., Cooper, C., Delmas, P.D. y Miller, P.D. 2006. Efficacy and tolerability of once-monthly oral ibandronate in postmenopausal osteoporosis: 2 year results from the MOBILE study. *Ann. Rheum. Dis.* 65: 654-661.
- Reid, I.R. 2002. Relationships among body mass, its components, and bone. *Bone.* 31: 547-555.
- Reseland, J.E., Syversen, U., Bakke, I., Qvigstad, G., Eide, L.G., Hjertner, Ø., Gordeladze, J., Drevon, C.A. 2001. Leptin is expressed in and secreted from primary cultures of human osteoblasts and promotes bone mineralization. *J. Bone Miner. Res.* 16: 1426-1433.

Rodríguez, J.A., Valdivia, G. y Trincado, P. 2007. Fracturas vertebrales, osteoporosis y vitamina D en la posmenopausia: Estudio en 555 mujeres en Chile. *Rev. Med. Chil.* 135: 31-36.

Rodríguez, J.P., Garat, S., Gajardo, H., Pino, A.M. y Seitz, G. 1999. Abnormal osteogenesis in osteoporotic patients is reflected by altered Mesenchymal Stem Cells dynamics. *J. Cell. Biochem.* 75: 414-423.

Rodríguez, J.P., Montecinos, L., Ríos, S., Reyes, P. y Martínez, J. 2000. Mesenchymal Stem Cells from osteoporotic patients produce a Type I Collagen-deficient Extracellular Matrix favoring adipogenic differentiation. *J. Cell. Biochem.* 79: 557-565.

Rodríguez, J.P., Ríos, S., Fernández, M. y Santibáñez, J.F. 2004. Differential activation of ERK1,2 MAP Kinase Signaling Pathways in Mesenchymal Stem Cells from Control and Osteoporotic Postmenopausal Women. *J. Cell. Biochem.* 92: 745-754.

Rodríguez, J.P., González, M., Ríos, S. y Cambiazo, V. 2004. Cytoskeletal organization of human mesenchymal stem cells (MSC) changes during their osteogenic differentiation. *J. Cell. Biochem.* 93: 721-731.

Rosen, E.D., Sarraf, P., Troy, A.E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D.S., Spiegelman, B.M. y Mortensen, R.M. 1999. PPAR γ is required for the differentiation of adipose tissue In vivo and In vitro. *Mol. Cell.* 4: 611-617.

Rosen, E.D. 2005. The transcriptional basis of adipocyte development. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 73: 31-34.

Rosen, E.D., Walkey, C.J., Puigserver, P. y Spiegelman, B.M. 2000. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.* 14: 1293-1307.

Rosen, E.D. y MacDougald, O.A. 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 7: 885-896.

Saladin, R., Fajas, L., Dana, S., Halvorsen, Y., Auwerx, J. y Briggs, M. 1999. Differential regulation of Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ 1 (PPAR γ 1) and PPAR γ 2 messenger RNA expresión in the early stages of adipogenesis. *Cell Growth Differ.* 10: 43-48.

Schilling, T., Nöth, U., Klein-Hitpass, L., Jakob, F. y Schütze, N. 2007. Plasticity in adipogenesis and osteogenesis of human mesenchymal stem cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 271: 1-17.

Sekiya, I., Larson, B., Vuoristo, J., Cui, J. y Prockop, D.J. 2004. Adipogenic differentiation of human adult stem cells from bone marrow stroma (MSCs). *J. Bone Miner. Res.* 19: 256-264.

Shaarawy, M., Abassi, A.F., Hassan, H., Salem y M.E. 2003. Relationship between serum leptin concentrations and bone mineral density as well as biochemical markers

of bone turnover in women with postmenopausal osteoporosis. *Fertil. Steril.* 79: 919-924.

Shida, D., Kitayama, J., Mori, K., Watanabe, T. y Nagawa, H. 2005. Transactivation of epidermal growth factor receptor is involved in leptin-induced activation of janus-activated kinase 2 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 in human gastric cancer cells. *Cancer Res.* 65: 9159-9163.

Shui, C., Spelsberg, T.C., Riggs, B.L. y Khosla, S. 2003. Changes in Runx2/Cbfa1 expression and activity during osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells. *J. Bone Miner. Res.* 18: 213-221.

Sinha, D., Addya, S., Murer, E. y Boden, G. 1999. 15-Deoxy-delta(12,14) prostaglandin J2: a putative endogenous promoter of adipogenesis suppresses the ob gene. *Metabolism.* 48: 786-791.

Song, L. y Tuan, R.S. 2004. Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *FASEB J.* 18: 980-982.

Sung, B., Park, S., Yu, B.P. y Chung, H.Y. 2004. Modulation of PPAR in aging, inflammation, and calorie restriction. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 59: 997-1006.

Sweeney, G. 2002. Leptin signalling. *Cell Signal.* 14(8): 655-663.

Takada, I., Mihara, M., Suzawa, M., Ohtake, F., Kobayashi, S., Igarashi, M., Youn, M.Y., Takeyama, K., Nakamura, T., Mezaki, Y., Takezawa, S., Yogiashi, Y., Kitagawa, H., Yamada, G., Takada, S., Minami, Y., Shibuya, H., Matsumoto, K. y Kato, S. 2007. A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signalling suppresses PPAR- γ transactivation. *Nat. Cell Biol.* 11: 1273-1285.

Takada, I., Suzawa, M., Matsumoto, K. y Kato, S. 2007b. Suppression of PPAR- γ transactivation switches cell fate of bone marrow stem cells from adipocytes into osteoblasts. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1116: 182-195.

Tang, Q.Q., Zhang, J.W. y Daniel Lane, M. 2004. Sequential gene promoter interactions of C/EBP β , C/EBP α , and PPAR γ during adipogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319: 235-239.

Thomas, T., Gori, F., Khosla, S., Jensen, M.D., Burguera, B. y Riggs, B.L. 1999. Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinology.* 140: 1630-1638.

Thomas, T. y Burguera, B. 2002. Is leptin the link between fat and bone mass? *J. Bone Miner. Res.* 17: 1563-1569.

Thomas, T. 2003. Leptin: a potential mediator for protective effects of fat mass on bone tissue. *Joint Bone Spine.* 70: 18-21.

- Tu, H., Kastin, A.J., Hsueh, H. y Pan, W. 2008. Soluble receptor inhibits leptin transport. *J. Cell. Physiol.* 214: 301-305.
- Wee, H., Huang, G., Shigesada, K. y Ito, Y. 2002. Serine phosphorylation of RUNX2 with novel potential functions as negative regulatory mechanisms. *EMBO Reports.* 3: 967-974.
- Xiao, G., Jiang, D., Thomas, P., Benson, M.D., Guan, K., Karsenty, G. y Franceschi, R.T. 2000. MAPK Pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor, Cbfa1. *J. Biol. Chem.* 275: 4453-4459.
- Xiao, G., Jiang, D., Gopalakrishnan, R. y Franceschi, R.T. 2002. Fibroblast Growth Factor 2 induction of the osteocalcin gene requires MAPK activity and phosphorylation of the osteoblast transcription factor, Cbfa1/Runx2. *J. Biol. Chem.* 277: 36181-36187.
- Yamauchi, M., Sugimoto, T., Yamaguchi, T., Nakaoka, D., Kanzawa, M., Yano, S., Ozuru, R., Sugishita, T. y Chihara, K. 2001. Plasma leptin concentrations are associated with bone mineral density and the presence of vertebral fractures in postmenopausal women. *Clin. Endocrinol.* 55: 341-347.
- Yang, G., Ge, H., Boucher, A., Yu, X. y Li, C. 2004. Modulation of direct leptin signaling by soluble leptin receptor. *Mol. Endocrinol.* 18: 1354-1362.
- Ye, P., Zhang, X.J., Wang, Z.J. y Zhang, C. 2006. Effect of aging on the expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the possible relation to insulin resistance. *Gerontology.* 52: 69-75.
- Zastrow, O., Seidel, B., Kiess, W., Thiery, J., Keller, E., Böttner, A. y Kratzsch, J. 2003. The soluble leptin receptor is crucial for leptin action: evidence from clinical and experimental data. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 27: 1472-1478.
- Zhao, Z., Zhao, M., Xiao, G. y Franceschi, R.T. 2005. Gene transfer of the Runx2 transcription factor enhances osteogenic activity of bone marrow stromal cells in vitro and in vivo. *Mol. Ther.* 12: 247-253.
- Zheng, H., Guo, Z., Ma, Q., Jia, H. y Dang, G. 2004. Cbfa1/osf2 transduced bone marrow stromal cells facilitate bone formation in vitro and in vivo. *Calcif. Tissue Int.* 74: 194-203.
- Zhou, H., Mak, W., Zheng, Y., Dunstan, C.R. y Seibel, M.J. 2008. Osteoblasts Directly Control Lineage Commitment of Mesenchymal Progenitor Cells through Wnt Signaling. *J. Biol. Chem.* 283: 1936-1945.

ARTICLES

Increased Adipogenesis of Osteoporotic Human-Mesenchymal Stem Cells (MSCs) is Characterized by Impaired Leptin Action

Pablo Astudillo,¹ Susana Ríos,¹ Luis Pastenes,² Ana María Pino,¹ and J. Pablo Rodríguez^{1*}

¹Laboratorio de Biología Celular, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), Universidad de Chile, Santiago, Chile

²Laboratorio de Genómica Evolutiva, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), Universidad de Chile, Santiago, Chile

Abstract The bone marrow contains mesenchymal stem cells (MSCs) that differentiate to the osteogenic and adipogenic lineages. The fact that the decrease in bone volume of age-related osteoporosis is accompanied by an increase in marrow adipose tissue implies the importance that the adipogenic process may have in bone loss. We previously observed that MSCs from control and osteoporotic women showed differences in their capacity to differentiate into the osteogenic and adipogenic pathways. In vitro studies indicate that bone marrow stromal cells are responsive to leptin, which increases their proliferation, differentiation to osteoblasts, and the number of mineralized nodules, but inhibits their differentiation to adipocytes. The aim of the present report was to study the direct effect of leptin on control and osteoporotic MSCs analyzing whether the protective effect of leptin against osteoporosis could be expressed by inhibition of adipocyte differentiation. MSCs from control, and osteoporotic donors were subjected to adipogenic conditions, in the absence or in the presence of 62.5 nM leptin. The number of adipocytes, the content of PPAR γ protein, and mRNA, and leptin mRNA were measured by flow cytometry, Western blot, and RT-PCR, respectively. Results indicate that control and osteoporotic MSCs differ in their adipogenic potential as shown by expression of active PPAR γ protein. Leptin exerted an antiadipogenic effect only on control MSCs increasing the proportion of inactive phosphorylated PPAR γ protein. Finally, results obtained during adipogenesis of osteoporotic cells suggest that this process is abnormal not only because of increased adipocyte number, but because of impaired leptin cells response. *J. Cell. Biochem.* 103: 1054–1065, 2008.

© 2007 Wiley-Liss, Inc.

Key words: leptin; adipocytes; mesenchymal stem cells; osteoporosis; PPAR γ ; adipogenesis

The bone marrow stroma contains mesenchymal stem cells (MSCs) that differentiate, among others, to the osteogenic, and adipogenic lineages. The clinical fact that a decrease in bone volume of age-related osteoporosis is accompanied by an increase in marrow adipose tissue [Meunier et al., 1971] also implies the possible reciprocal relationship that is postulated to exist between the two differentiation pathways.

Many experimental models have provided substantial evidence for a reciprocal relationship between these cell lineages [Meunier et al., 1971; Beresford et al., 1992; Jilka et al., 1996; Nuttall et al., 1998; Rodríguez et al., 1999, 2000; Rosen and Buxsein, 2006].

We have previously observed that MSCs obtained from control and osteoporotic women show differences in their capacity to differentiate into the osteogenic and adipogenic pathways [Rodríguez et al., 1999, 2000]. These observations, coupled with the proposal that osteoblastic, and adipocyte differentiation pathways are regulated jointly, points that marrow adipogenesis is of concern in some osteogenic disorders [Meunier et al., 1971; Nuttall et al., 1998; Rodríguez et al., 2000; Rosen and Buxsein, 2006].

The environment of intracellular and extracellular signals controls MSCs differentiation

Grant sponsor: FONDECYT; Grant number: 1050930.

*Correspondence to: J. Pablo Rodríguez, Laboratorio de Biología Celular, INTA, Universidad de Chile. Macul 5540, Macul. Casilla 138-11, Santiago, Chile.

E-mail: jprodrig@inta.cl

Received 23 April 2007; Accepted 5 July 2007

DOI 10.1002/jcb.21516

© 2007 Wiley-Liss, Inc.

into osteoblast or adipocyte. Lineage commitment is determined through phenotype-specific transcription factors, such as osteoblast-specific Runx2/Cbfa 1, and adipocyte-specific peroxisome proliferators activated receptor gamma (PPAR γ) [Tontonoz et al., 1994; Ducy et al., 1997; Karsenty, 2001; Rosen and Spiegelman, 2001]. PPAR γ is a key regulator of osteoblast, and adipocyte differentiation, and its activation play a pivotal role in selection of adipogenesis over osteoblastogenesis [Lecka-Czernik et al., 1999]. PPAR γ is a ligand-activated transcription factor that belongs to the nuclear hormone receptor superfamily [Mangelsdorf and Evans, 1995; Kersten et al., 2000; Rosen and Spiegelman, 2001]. PPAR γ is expressed early in the adipocyte differentiation program, and is activated by long-chain fatty acids, peroxisome proliferators, and the thiazolidinedione class of antidiabetic agents [Mangelsdorf and Evans, 1995; Kersten et al., 2000; Rosen and Spiegelman, 2001].

The transcriptional activity of PPAR γ is positively regulated by specific lipophilic ligands [Rosen and Spiegelman, 2001] and negatively regulated by phosphorylation on a mitogen-activated protein kinase (MAPK) consensus site at Ser 112 [Hu et al., 1996; Reginato et al., 1998; Chan et al., 2001] as well as by activation of p38 MAPK α [Aouanadi et al., 2006]. Phosphorylation-induced inhibition of the transcriptional activity of this transcription factor provides a mechanism to switch off the response to the ligand. The post-translational modifications of PPAR γ activity through phosphorylation appears to be the pathway by which several growth factors and cytokines affect the transcription of numerous genes involved in lipid metabolism [Diradourian et al., 2005].

Leptin has recently emerged as a potential candidate responsible for the protective effects of fat on bone tissue [Rosen and Bouxsein, 2006; Thomas et al., 2000]. Published data on leptin effects on bone metabolism are apparently contradictory [Thomas and Burguera, 2002]. The effects of leptin are thought to be largely mediated via the hypothalamus [Karsenty, 2001]; however, the observation that the leptin receptor (OB-R) is widely expressed throughout the body suggests that leptin also may operate directly in peripheral tissues [Tartaglia, 1997; Reseland et al., 2001; Holloway et al., 2002].

Leptin is able to stimulate, through MAPK, and signal transducers, and activators of trans-

cription (STAT) signals [Ahima and Osei, 2004; Catalano et al., 2004]. Leptin-activated OB-R regulates well-known insulin-targets, such as IRS-1, MAP kinase, ERK, Akt, AMP kinase, and PI3- kinase, raising the possibility that leptin pathways act in concert with insulin to control energy metabolism, and other cellular processes [Ahima and Osei, 2004]. The leptin signal is terminated by induction of suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a member of the family of proteins which inhibits the JAK-STAT signaling cascade [Bjorbaek et al., 1999].

Several *in vitro* studies indicate that bone marrow stromal cells are responsive to leptin, which increases their proliferation, differentiation to osteoblastic lineage, and the number of mineralized nodules [Takahashi et al., 1997; Thomas et al., 1999; Reseland et al., 2001], but inhibits their differentiation to adipocytes [Thomas et al., 1999]. These observations suggest that leptin may participate in the regulation of bone mass, but the mechanism by which this occurs remains unclear. The expression of a functional leptin receptor has been demonstrated in precursor cells of the osteoblast lineage [Thomas et al., 1999; Kim et al., 2003] showing that they can be direct targets for leptin. In this regard, we have studied the direct action of leptin on MSCs, characterizing a high affinity OB-R in these cells [Hess et al., 2005]. We demonstrated that the binding capacity of OB-R in MSCs increased through osteogenic and adipogenic (AD) cell differentiation. Osteoporotic MSCs showed significant lower leptin binding capacity than control cells at early (2–3 days) cell differentiation. In addition, leptin exerted a similar and low stimulatory osteogenic effect on both control, and osteoporotic cells, while, it significantly inhibited adipocyte differentiation only in control cells. Leptin did not affect AD differentiation of osteoporotic cells [Hess et al., 2005]. Finally, we demonstrated that leptin increased aromatase activity of MSCs during osteogenic but not during adipogenic differentiation [Pino et al., 2006].

The aim of the present report was to further study the direct effect of leptin on control and osteoporotic MSCs analyzing whether the protective effect of leptin against osteoporosis could be expressed by inhibition of adipocyte differentiation, as proposed by Thomas et al. [1999] and Thomas and Burguera [2002]. Results indicate that control and osteoporotic

MSCs differ in their AD potential as shown by expression of active PPAR γ protein. In addition, leptin exerted an antiadipogenic effect only on control MSCs by increasing the proportion of inactive phosphorylated PPAR γ protein. Finally, osteoporotic MSCs had marked impaired leptin response, which was related with increased AD potential of cells.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Post-menopausal women aged 65–86 years old who required bone surgery because of bone fracture at the Trauma Section of Hospital Sótero del Río, Santiago, Chile, were asked to volunteer as bone marrow donors. Bone marrow was obtained by iliac crest aspiration during surgical procedures [Rodríguez et al., 1999]; written informed consent was obtained from all subjects, and ethical approval was obtained from the Hospital Sótero del Río and Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA) ethics committees. Bone mineral density (BMD) was measured for each subject within 4 weeks after surgery using dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) (LUNAR, Prodigy, General Electric Medical Systems, Madison, WI). Donors were classified as control or osteoporotic according to their BMD value; control donors had BMD higher than -2.5 standard deviations (SD) of the mean BMD for young adults, and osteoporotic donors had BMD lower than -2.5 SD, and hip fracture [Raisz, 1997]. Control and osteoporotic donors considered themselves healthy, except for fracture, and were not under glucocorticoid or estrogen replacement therapy. Demographic characteristics of donors are summarized in Table I.

TABLE I. Demographic Characteristics of Donors

Characteristic	Control	Osteoporotic	P values
N	10	6	
Age (years)	71.6 \pm 3.7	73.2 \pm 8.1	0.643
LS T score ^a	-0.2 \pm 1.9	-4.0 \pm 0.9	0.001
BMD (g/cm ³) ^b	1.2 \pm 0.2	0.7 \pm 0.1	0.001
BMI (kg/m ²) ^c	29.7 \pm 5.2	25.5 \pm 3.5	0.043

^aLS, lumbar spine; T score, number of standard deviations by which an individual value differs from a young adult population.

^bBMD, bone mineral density.

^cBMI, body mass index.

Reagents

Tissue culture media and reagents were purchased from either Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO), Gibco/BRL (Gaithersburg, MD) or US Biologicals (Swamscott, MA). Tissue culture plastic ware was obtained from Nunc (Naperville, IL). Recombinant human leptin (rh-leptin) was purchased from Chemicon International, Inc. (Termeccula, CA).

Antibodies: Monoclonal mouse anti-PPAR γ was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), monoclonal rabbit anti phosphorylated PPAR γ was from Upstate (Charlottesville, VA), monoclonal mouse anti beta-actina was from Sigma, peroxidase conjugated goat anti-mouse and anti-rabbit were from Rockland (Gilbertsville, PA).

Taq Polymerase, dNTPs, primers, MgCl₂, and PCR reaction buffer, were purchased from Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA), reverse transcriptase M-MLV was from Promega (Madison, WI) and RNAWiz was from Ambion (Austin, TX).

SDS-PAGE and nitrocellulose membranes were acquired from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). PVDF membranes and ECL kit were purchased from Perkin Elmer Life Sciences (Boston, MA).

Cell Preparation and Culture Methods

MSCs were classified as control (c-MSCs) or osteoporotic (o-MSCs) according to whether they derived from control or osteoporotic donors. MSCs were isolated from bone marrow as previously described [Jaiswal et al., 1997]. Briefly, 10 ml of bone marrow aspirate was added to 20 ml of Dulbecco's Modified Eagle medium high glucose (D-MEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS) (basal medium) and was centrifuged to pellet the cells, discarding the fat layer. Cells were resuspended in basal medium and fractionated on a 70% Percoll density gradient. The MSCs-enriched low-density fraction was collected, rinsed with basal medium, and plated at a density of $1-2 \times 10^7$ nucleated cells/100 mm dish. Cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. After 4 days in culture, non-adherent cells were removed and fresh culture medium was added. Basal medium was replaced by fresh medium twice weekly. When culture dishes became near confluence, cells were detached by mild treatment with trypsin (0.25%, 5 min,

37°C) and replated at 1/3 the original density to allow for continued passage. The experiments described here were performed after the fourth cell passage.

Adipogenic Differentiation

MSCs obtained from control and osteoporotic donors (1×10^5 cells/35 mm dish) were maintained in culture in basal medium for at least 4 days before adding basal or AD medium during defined times. The adipogenic medium consisted of basal medium supplemented with 1 μ M dexamethasone, 10 μ g/ml insulin, 0.45 mM isobutyl-methyl-xanthine, and 0.1 mM indomethacin in the presence of freshly prepared leptin (62.5 nM, or 1 μ g/ml) or its vehicle (PBS). This was replaced by fresh adipogenic medium every 4 days.

The adipocyte number was determined after 14 days in culture. Cells were released from the culture dish with a mild trypsin treatment (0.25%, 5 min at 37°C) and counted in a hemocytometer. Cell concentration was adjusted to 1×10^6 cells/ml and MSCs were tested for their adipocyte content by flow cytometric quantitation of lipid accumulation. Cells were placed in freshly diluted Nile Red (1 mg/ml) and analyzed by flow cytometry [Dennis et al., 1999] (FACS-Calibur, Becton Dickinson, Franklin, NJ).

Immunofluorescence Staining

Cells were seeded on coverslips in 24 multiwell plates and cultured under basal or adipogenic conditions. After treatment, cells were washed two times with PBS, and fixed with a 3.7% formaldehyde solution in PBS, for 15 min at room temperature. Cells were afterwards permeabilized with a 0.2% Triton X-100 in 3.7% formaldehyde solution, for 15 min at room temperature. The fixed cells were re-hydrated with Tris buffer saline (TBS) (0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl, 25 mM Tris-base, pH 8.0), and incubated for 45 min in blocking solution (3% BSA in TBS) at room temperature. After this, cells were incubated with a specific primary mouse anti-PPAR γ antibody, at 1:25 dilution in blocking solution during 45 min at 37°C and subsequently with the secondary antibody, FITC-conjugated rabbit anti-mouse IgG, at a 1:250 dilution in 3% BSA-TBS during 45 min at 37°C. Finally, the cells were rinsed in TBS, mounted in DABCO/mowiol and examined with an epifluorescence microscope (100 \times objective, Nikon, Labophot-2, Japan). In the

controls, the first or the second antibodies were omitted.

Western Blot

Cells cultured under basal or AD conditions were lysed as described by Lecka-Czernik et al. [1999]. Proteins (20 μ g) from cells lysates were denatured with sample buffer (2% SDS, 10% glycerol, 0.06 M Tris-HCl, 0.01% bromophenol blue, 20% β -mercaptoethanol, pH 6.8) during 5 min at 100°C. Proteins were separated by 8% SDS-PAGE. Then, samples were transferred to nitrocellulose or PVDF membranes, for 1 h at 100 V. Membranes were blocked with 3% BSA in 0.05% TBS-Tween, for 1 h at room temperature. Incubation with the corresponding primary antibody (anti-PPAR γ at a 1:500 dilution, anti-phosphorylated PPAR γ at a 1:3,000 dilution, and anti- β -actin at a 1:5,000 dilution, in blocking solution) was performed during 16 h at 4°C. Membranes were washed three times with TBS-Tween 0.05%, and incubated with the corresponding peroxidase conjugated secondary antibody at a 1:5,000 dilution during 2 h at room temperature. Immunoreactive bands were visualized using the ECL kit.

Quantification was performed using Kodak Digital 1D software. β -Actin was used as load control.

RNA Extraction and RT-PCR Analysis

Cells cultured for determined times were released from the culture dishes by a mild treatment with trypsin, cells were collected, and suspended with 1 ml of RNeasy. The extracted RNA was quantified in a spectrophotometer (MBE2000, Perkin Elmer) and stored at a -80°C. RNA integrity was visualized by electrophoresis under denaturing conditions.

The complementary cDNA was synthesized using reverse transcriptase M-MLV, through a 15 min cycle at 45°C, then at 4°C in ice for 5 min, and an extension of 45 min at 70°C. For PCR reactions, 300 ng of cDNA was amplified with 30 μ l of reaction mix 1 \times PCR reaction buffer, 1.5 mM MgCl $_2$, 6 pmol of each primer, 0.2 mM dNTPs, 22.3 μ l of nucleases-free water, and 2.5 U of Taq Polymerase. Table II shows the primer sequences used in this study, the melting temperature (T_m), and the sizes of the PCR products. The PCR products were separated in 1.2% agarose gels.

TABLE II. Primer Sequences for PCR Amplification

Gen	Sequence	No. of cycles	T _m (°C)	Size of PCR product
PPAR _γ	5' CAGTGGGGATGCTCATAA 3' 5' CTTTGGGCATACTCTGTGAT 3'	35	54	422
Leptin	5' GTAGAGTTTGAAGGAGGTGA 3' 5' CTGGGAATTAGCCATTGTG 3'	35	57	349
aP2	5' AACCTTAGATGGGGGTGTCCTG 3' 5' TCGTGGAAGTGACGGCTTTC 3'	36	58	125
Adipsin	5' CAAGCAACAAGTCCCGAGC 3' 5' CCTGCGTTCAAGTCATCCTC 3'	36	57	261
GPDH	5' ACCACAGTCCATGCCATCAC 3' 5' TCCACCACCTGTTGCTGTA 3'	29	60	452

Statistical Analysis

All measurements were performed in triplicate from at least three different samples. Values are expressed as mean \pm SD. Two-sample Student's *t*-test was used to evaluate differences between samples and the respective controls; $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

AD Differentiation of MSCs and Effect of Leptin

Control and o-MSCs showed dissimilar capacity for AD differentiation: o-MSCs developed twofold more adipocytes than c-MSCs (Table III). Since previous studies showed that MSCs developed responses to leptin, we tested the effect of 62.5 nM leptin on AD differentiation. This dose was selected considering previous observations [Hess et al., 2005; Pino et al., 2006]. We observed that the addition of leptin during AD treatment of cells decreased by 60% AD differentiation of c-MSCs, while it had no effect on o-MSCs. Therefore, in the presence of leptin AD differentiation is fivefold higher in osteoporotic than in c-MSCs. An initial contamination with adipocytes in both

TABLE III. Effect of Leptin on Adipogenic Differentiation of MSCs

Cells types	Adipocytes (%)	
	-Leptin	+Leptin
Control	11.5 \pm 3.3	4.6 \pm 0.8*
Osteoporotic	22.3 \pm 6.5**	21.9 \pm 5.7**

Cells (1×10^5)/dish 35 mm obtained from control and osteoporotic donors were cultured in adipogenic medium in the absence or in the presence of leptin (62.5 nM). After 14 days in culture, adipocyte number was measured by flow cytometric analysis as described in Materials and Methods section.

* $P < 0.05$ as compared with -leptin value.

** $P < 0.05$ as compared with control values.

types of MSCs was discarded, since flow cytometric analysis, and adipogenic markers like adipsin, aP2, and leptin were negative at day 0 of AD differentiation (data not shown).

MSCs Derived From Control and Osteoporotic Donors Have Different PPAR_γ Activity

Immunocytochemistry for PPAR_γ in MSCs showed in addition of an exclusive nuclear localization to the transcription factor, different fluorescence intensities in control, and o-MSCs. Low fluorescence for PPAR_γ, both under basal, and adipogenic conditions was apparent in c-MSCs (Fig. 1A,B), while under these same experimental conditions a high fluorescent signal was developed by o-MSCs (Fig. 1D,E). Leptin addition during the adipogenic treatment of c-MSCs further decreased fluorescent signal for PPAR_γ, but in o-MSCs no change in fluorescence intensity was observed after the addition of the hormone (Fig. 1C,F)

Western blots analysis allowed to further corroborate these observations (Fig. 2A). A significant difference in the amount of PPAR_γ produced by control, and o-MSCs was detected by densitometric analysis in cells before or during AD differentiation, so that the mean PPAR_γ protein level was sixfold higher in o-MSCs than in c-MSCs (Fig. 2B). During early AD differentiation PPAR_γ level increased twofold in control cells, while o-MSCs maintained unchanged their high PPAR_γ level until 15 days of AD differentiation.

Leptin Affects Differently PPAR_γ Protein Content in Control and Osteoporotic MSCs

Using Western analysis we appreciated that leptin added during AD differentiation affected differentially the immuno activity for PPAR_γ in control and osteoporotic cells (Fig. 2A). Leptin significantly decreased the expression of PPAR_γ

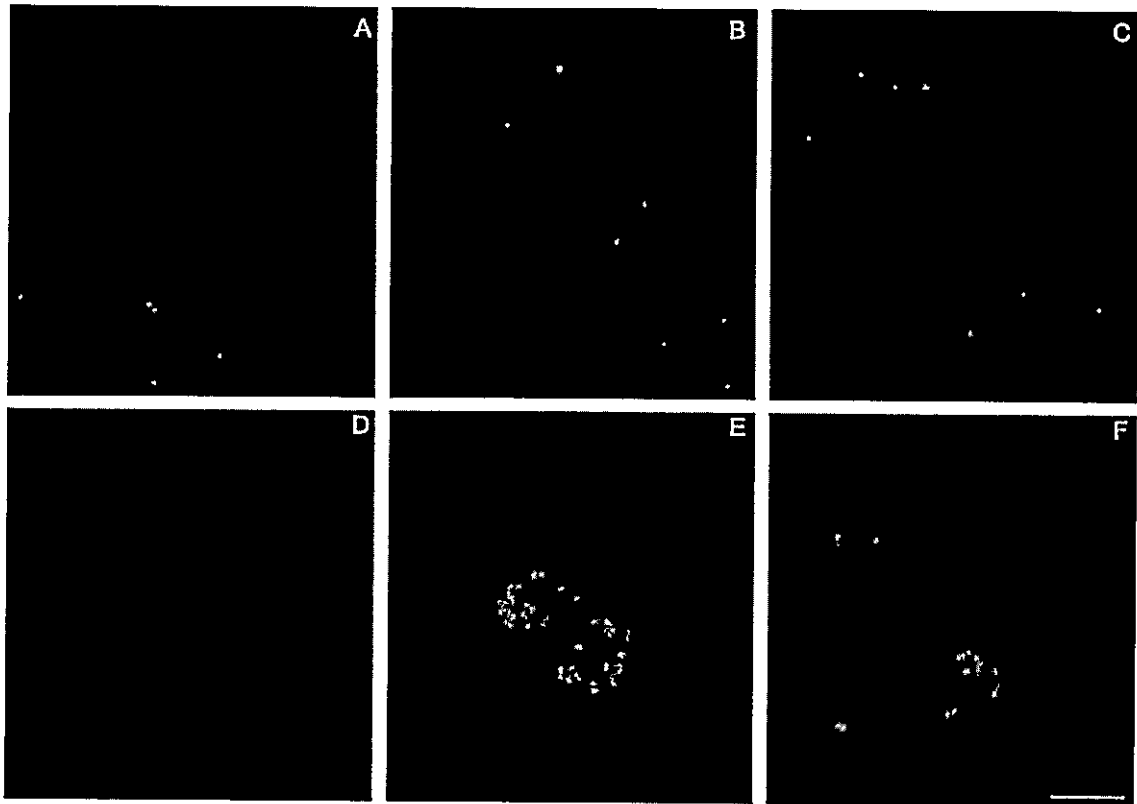


Fig. 1. Specific immunocytofluorescence for PPAR γ during adipogenic (AD) differentiation of control (upper row) and osteoporotic (bottom row) human mesenchymal stem cells (MSCs). Cells were incubated in basal (A,D), adipogenic (B,E), or adipogenic plus 62.5 nM leptin (C,F) medium for 7 days. Cells were fixed and treated as specified in methods, using mouse anti PPAR γ antibody as the primary antibody. Images were obtained from Nikon, Labophot-2 microscope at same exposure settings. The original magnification was 100 \times . Bar = 10 μ m.

in control cells until day 5 of differentiation, the mean expression level of PPAR γ decreased 60–70% in the presence of leptin, as compared with cells differentiating in the absence of leptin (Fig. 2C). In contrast, the presence of leptin during AD differentiation of o-MSCs did not affect the immunoactivity for PPAR γ up to day 5 although a decrease of 30–40% of PPAR γ immuno activity was observed only at day 7 of AD differentiation (Fig. 2D).

Analysis of mRNA for PPAR γ in Both Types of MSCs

To analyze whether the difference in PPAR γ among control and o-MSCs is also expressed at the mRNA for PPAR γ level, the relative amount of PPAR γ mRNA was measured by RT-PCR. As shown in Figure 3, the expression level of mRNA for PPAR γ was similar in both cells types and remained almost constant through all period studied. Moreover, leptin did not modify the

levels of mRNA for PPAR γ in both types of cells (Fig. 3)

Leptin Increased Phosphorylated PPAR γ Level in Control MSCs

Since PPAR γ transcriptional activity is modified by phosphorylation at Ser 112, we analyzed by specific Western blots whether the level of this PPAR γ differs among c-MSCs and o-MSCs (Fig. 4A). Before differentiation both control and o-MSCs had a similar level of phosphorylated PPAR γ (Fig. 4B,C). Considering the high PPAR γ content in o-MSCs (Fig. 2B), a much higher phosphorylated PPAR γ /PPAR γ ratio results in controls than in osteoporotic cells. During AD differentiation of control cells, phosphorylated PPAR γ levels decreased by 50% up to day 7, recovering the basal level at the end of the differentiation period studied (Fig. 4B). However, when AD differentiation of these cells was developed in the presence of

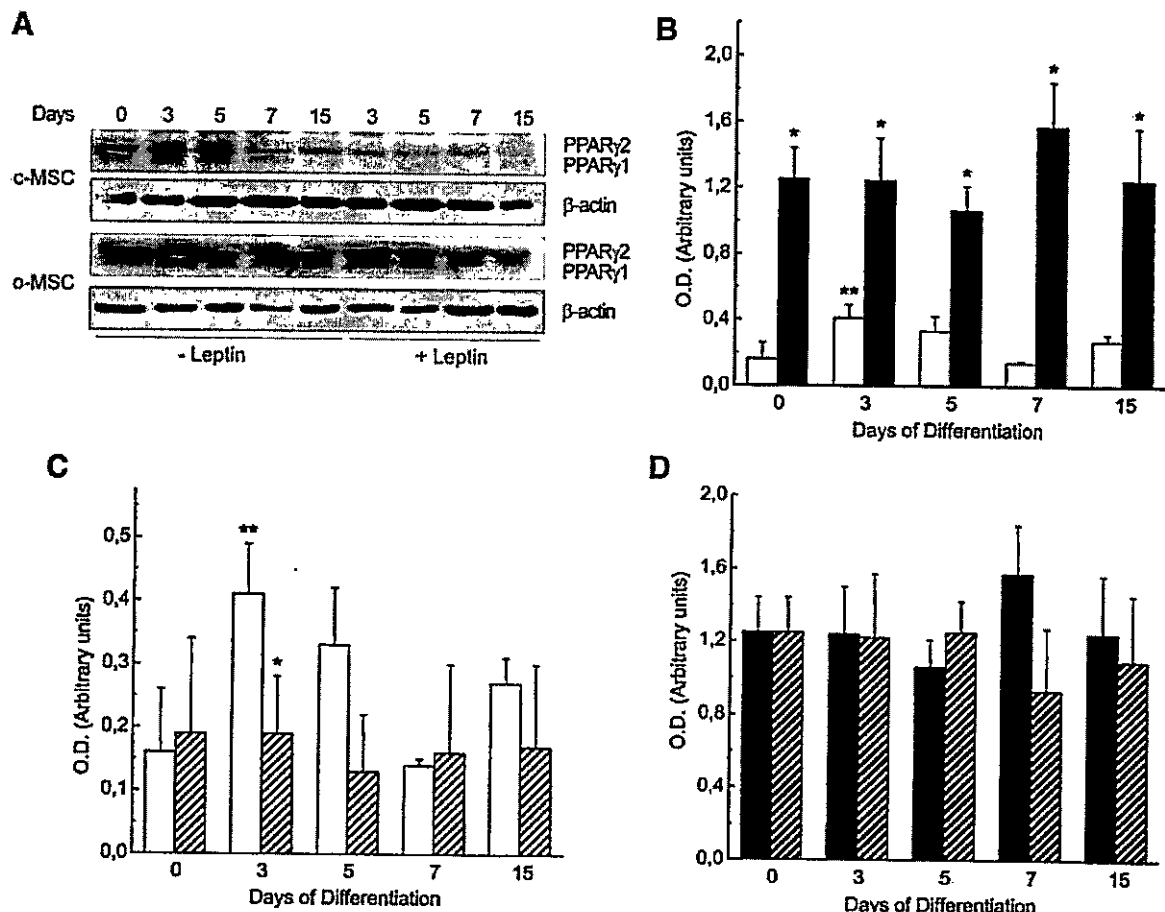


Fig. 2. Effect of adipogenic differentiation with or without leptin on PPAR γ protein level. Control (c-MSCs) and osteoporotic (o-MSCs) human mesenchymal stem cells were cultured under adipogenic conditions in the absence or presence of 62.5 nM leptin for specified time. **A:** Representative Western blots analysis of PPAR γ proteins separated by SDS-PAGE. Histograms represent relative PPAR γ level as detected by western blots and densitometric analysis in: **(B)** c-MSCs (white bars) and o-MSCs (black bars), * $P < 0.05$ compared with respective value of

c-MSCs. ** $P < 0.05$ compared with day 0 value of AD differentiation; **(C)** c-MSC incubated in the absence (white bars) or in the presence of 62.5 nM leptin (dashed bars), * $P < 0.05$ compared with value in the absence of leptin. ** $P < 0.05$ compared with value of day 0 of AD differentiation, and **(D)** o-MSC incubated in the absence (black bars) or in the presence of 62.5 nM leptin (dashed bars). All data were normalized by β -actin, expressed as optical density and represent the mean \pm SE of three different samples.

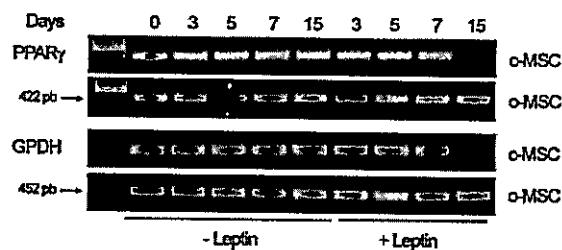


Fig. 3. Effect of leptin on PPAR γ mRNA expression by control (c-MSCs) and osteoporotic (o-MSCs) human mesenchymal stem cells. Cells were cultured under adipogenic condition in the absence or in the presence of leptin 62.5 nM leptin, during specified time. Total RNA was extracted and subjected to RT-PCR analysis as described in Materials and Methods section.

leptin phosphorylated PPAR γ levels were maintained at the basal levels throughout the period studied (Fig. 4B). On the other hand, no change in the level of phosphorylated PPAR γ was observed in o-MSCs, maintaining their basal level during AD differentiation, either in the absence or the presence of leptin.

Leptin mRNA Expression by MSCs During Adipogenic Differentiation

A representative analysis by RT-PCR of the leptin gene expression during AD differentiation of both types of MSCs is shown in Figure 5. In the absence of exogenously added leptin, the expression of the hormone transcript in c-MSCs

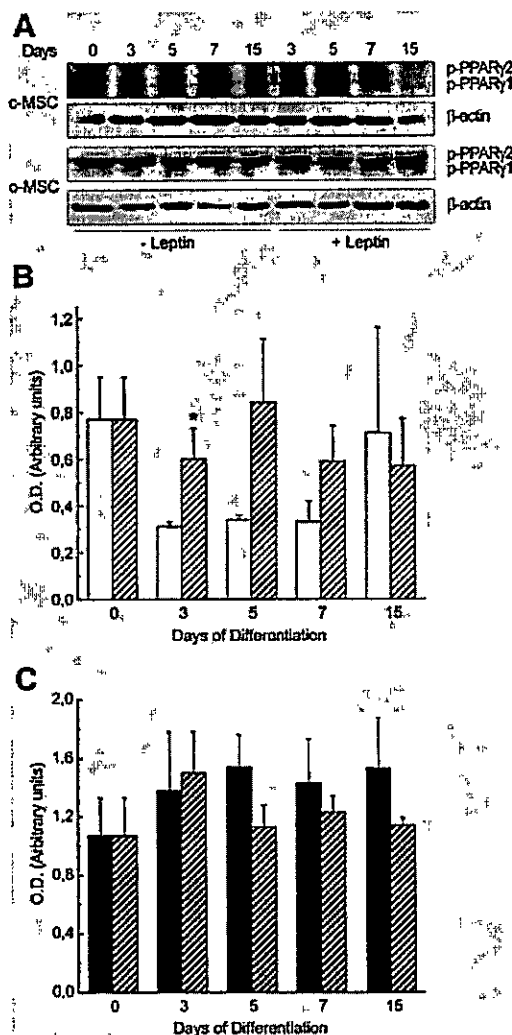


Fig. 4. Effect of leptin on phosphorylated PPAR γ (p-PPAR γ) level in control (c-MSCs) and osteoporotic (o-MSCs) human mesenchymal stem cells. Cells were cultured under adipogenic medium in the absence or presence of 62.5 nM leptin. **A:** Representative Western blots analysis for p-PPAR γ separated by SDS-PAGE. Histograms represent relative p-PPAR γ levels in c-MSC (**B**) and o-MSCs (**C**), incubated in the absence (white bars) or in the presence of 62.5 nM leptin (gray bars), as detected by Western blots and densitometric analysis. Data were normalized by β -actin, expressed as optical density and represent the mean \pm SE of three different samples. * $P < 0.05$ compared with value in the absence of leptin. ** $P < 0.05$ compared with value of day 0 of AD differentiation.

changed from undetected in basal conditions to measurable levels from day 3 up to day 15 of AD differentiation. The addition of leptin during AD differentiation noticeably increased leptin transcript level during early differentiation (3–5 days), but afterwards the transcript level decreased. In contrast, o-MSCs showed

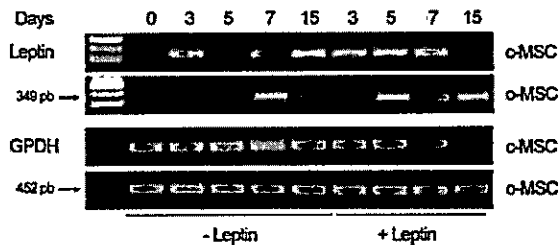


Fig. 5. Representative RT-PCR analysis of leptin mRNA expression by control (c-MSCs) and osteoporotic (o-MSCs) mesenchymal stem cells. Cells were cultured under adipogenic conditions in the absence or in the presence of 62.5 nM leptin during specified time. Total RNA was extracted and subjected to RT-PCR analysis as described in Materials and Methods section.

no leptin transcript before day 5 in the absence of exogenously added hormone, although the leptin transcript was detected from day 5 of AD differentiation in the presence of added leptin (Fig. 5).

DISCUSSION

In the bone marrow, MSCs are common multipotential progenitors for osteoblasts, and adipocytes [Pittenger et al., 1999]. It has been proposed that the close relationship between these lineages underlies the reciprocal relationship between increased adipocytes and decreased bone formation in conditions of bone loss like age-related osteoporosis [Jilka et al., 1996; Verma et al., 2002], microgravity [Zayzafoon et al., 2004] and diabetes [Forsen et al., 1999]. In this study, we observed that leptin significantly inhibited adipocyte differentiation only in control cells (60%). The effect of leptin on c-MSCs agrees with data obtained in immortalized human marrow stromal cell lines [Thomas et al., 1999]; however, results obtained during adipogenesis of osteoporotic cells suggest that this process is abnormal not only because of increased adipocyte number, but because of impaired leptin cells response.

We studied PPAR γ protein, and mRNA as markers of the AD potential of control, and osteoporotic cells, since PPAR γ appears to be a key component in the determination, and differentiation process [Rosen and Spiegelman, 2001]. The fact that at basal or along AD differentiation, control cells had much lower content of the transcription factor protein than osteoporotic cells explains at the molecular level the restricted adipogenesis observed in control cells, suggesting that in these cells an interplay

of cell signals restrict AD differentiation [Aouanadi et al., 2006]. Leptin could be one of such signals, since its activity limited cells AD potential in control cells by originating a further decrease in the level of PPAR γ protein from day 3 to 15 of AD differentiation, accordingly with the reductive effect of the hormone on adipocyte number. In contrast, osteoporotic cells did not change their high PPAR γ protein content through AD differentiation, nor as a response to leptin addition. Thus, in addition to differences in the level of PPAR γ protein among control, and osteoporotic cells, these cells showed different capability for developing a leptin response.

Studies in human adipose tissue have found no difference in the mRNA levels of PPAR γ among lean controls or obese or type 2 diabetic subjects, nor with aging [Auboeuf et al., 1997; Imbeault et al., 2001]. In this study, control and o-MSCs showed similar amount of PPAR γ mRNA, either before or through AD differentiation, in the presence or the absence of leptin, suggesting that post-transcriptional regulation could explain the different PPAR γ protein activity of both types of cells. Several factors that inhibit AD differentiation cause MAPK-mediated phosphorylation of PPAR γ with subsequent loss of its transcriptional activity [Hu et al., 1996; Reginato et al., 1998; Chan et al., 2001]. Here we examined phosphorylated PPAR γ protein on the MAPK consensus site Ser 112 as a measure of inactive PPAR γ protein. A relationship among the AD potential and phosphorylated PPAR γ level was observed only in control cells; accordingly with AD stimulation, the level of phosphorylated PPAR γ decreased in these cells. Since both PPAR γ mRNA and protein have a short half-life [Waite et al., 2001], even slight changes in the amount of active/inactive PPAR γ protein could affect the AD potential of cells. Consequently, we found that leptin added to control cells during early adipogenesis significantly increased phosphorylated PPAR γ protein, consistent with the protective effect of leptin on adipogenesis. In contrast, in osteoporotic cells the level of phosphorylated PPAR γ did not change during AD differentiation either in the presence or absence of the adipokine. Therefore, it appears that o-MSCs have lost the MAPK-dependents activities that in control cells determine the appropriate active/inactive relationship of PPAR γ protein.

Several observations suggest that leptin may be an important paracrine signaling molecule in the bone marrow microenvironment [Laharrague et al., 1998; Thomas et al., 1999; Reseland et al., 2001; Gordeladze et al., 2002; Hess et al., 2005]. Here we show that leptin restricts AD potential in c-MSCs, by increasing phosphorylated PPAR γ ; in contrast, leptin action is hampered in osteoporotic MSCs during early adipogenesis, linking this failure with the increased AD potential of these cells. Apparently, this would be different to the response observed in vivo in the leptin-deficient *ob/ob* mouse [Hamrick et al., 2005; Wang et al., 2005], in which the defective leptin response would result from decreased leptin availability [Hamrick et al., 2005].

Diminished leptin action on MSCs could be the result of changes at the receptor or post-receptor levels. Previously, we showed an OB-R binding activity in these MSCs [Hess et al., 2005]. In the present study, we measured the activity of leptin gene by RT-PCR showing that osteoporotic MSCs had much lower expression of this gene than control cells. Leptin transcript in control cells was not detected under basal conditions, but its transcription was measurable from day 3 of AD differentiation. Moreover, after exogenously added leptin, its transcript level further increased in control cells. In contrast, despite increased AD capacity of osteoporotic MSCs, no leptin transcript was detected during differentiation of these cells in the absence of the hormone. Therefore, impaired leptin action on o-MSCs could result in part because of decreased leptin production. Abolished leptin transcription in these cells could result from the high activity of PPAR γ , since experimental cells and human studies have concluded that high PPAR γ activation inhibits leptin gene transcription [Kallen and Lazar, 1996; Sabatakos et al., 2000; Patel et al., 2003]. In addition, in human pre-adipocytes it has been observed that inhibition of different signaling pathways resulted in inhibition of leptin secretion, but not always inhibition of adipocyte differentiation [Patel et al., 2003].

Therefore, it could be proposed that during early adipogenesis of o-MSCs the diminished OB-R level [Hess et al., 2005] as well as low leptin production would determine sub-optimal cell leptin signaling. This proposition is supported by the observation that o-MSCs in the presence of exogenously added leptin increased

their production of the adipokine transcript from day 5 of AD differentiation, implying that these cells require high leptin doses to develop some cell response.

Insufficient leptin action has been recognized as underlying in clinical states like metabolic syndrome, obesity (induced either by diet or lack of leptin or its receptor), lipodystrophy, Cushing's syndrome, polycystic ovarian disease, and aging [Unger, 2003]. It appears exciting that a failure of leptin cell signaling may cooperate in the anomalous adipogenesis of o-MSCs. During development of osteoporosis several factors could play a part inducing cell impairment of leptin action, like increased SOC-3 induction by cytokines [Bjorbaek et al., 2000], increased endogenous or exogenous glucocorticoids [Mazziotti et al., 2006], decreased estrogen [Casabiell et al., 1998], and protein tyrosine phosphatase-1B [Cheng et al., 2002; Zabolotny et al., 2002]. On the other hand, the endogenous production of lipophylic ligands responsible for activating PPAR γ transcription factors is rather unknown, both at physiological or pathological conditions.

From our observations it could be concluded that leptin signal malfunctioning in o-MSCs includes at least the following issues: (1) diminished OB-R binding at early AD differentiation [Hess et al., 2005]; (2) loss of the MAPK-dependents activities that determine the appropriate active/inactive relationship of PPAR γ protein; and (3) poor leptin production by cells.

In summary, our results show different AD potential among control and osteoporotic cells that could be related to PPAR γ protein activity. In addition, we demonstrated that leptin exerts an antiadipogenic effect on c-MSCs by increasing the proportion of inactive PPAR γ protein. Osteoporotic MSCs characterized by impaired leptin cell response which result in increased AD potential of cells.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank to Dr. O. Brunser for critical review of the manuscript and valuable comments. Also, the authors are grateful to Mrs. V. Simon for performing the flow cytometric analysis.

REFERENCES

- Ahima RS, Osei SY. 2004. Leptin signaling. *Physiol Behav* 81:223-241.
- Aouanadi M, Laurent K, Prot M, Le Marchand-Brustel Y, Binétry B, Bost F. 2006. Inhibition of p38MAPK increases adipogenesis from embryonic to adult stages. *Diabetes* 55:281-289.
- Auboef D, Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Fréring V, Riou JP, Staels B, Auwerx J, Laville M, Vidal H. 1997. Tissue distribution and quantitation of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor- α in humans: No alterations in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes* 46:1319-1327.
- Beresford JN, Bennett JH, Devlin C, Leboy PS, Owen ME. 1992. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Sci* 102:341-351.
- Bjorbaek C, El-Haschimi K, Frantz JD, Flier JS. 1999. The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. *J Biol Chem* 274:30059-30065.
- Bjorbaek C., Lavery HJ, Bates SH, Olson RK, Davis SM, Flier JS, Myers MG, Jr. 2000. SOCS-3 mediated feedback inhibition of the leptin receptor via Tyr985. *J Biol Chem* 275:40649-40657.
- Casabiell X, Pineiro V, Peino R, Lage M, Camina J, Gallego R, Vallejo LG, Dieguez C, Casanueva FF. 1998. Gender differences in both spontaneous and stimulated leptin secretion by human omental adipose tissue in vitro: dexamethasone and estradiol stimulate leptin release in women, but not in men. *J Clin Endocrinol Metab* 83:2149-2155.
- Catalano S, Mauro L, Marsico S, Giordano C, Rizza P, Rago V, Montanaro D, Maggiolini M, Panno ML, Ando S. 2004. Leptin induces, via ERK1/ERK2 signal, functional activation of estrogen receptor α in MCF-7 cell. *J Biol Chem* 279:19908-19915.
- Chan GK, Deckelbaum RA, Bolivar I, Goltzman D, Karaplis AC. 2001. PTHrP inhibits adipocyte differentiation by down-regulating PPAR gamma activity via a MAPK-dependent pathway. *Endocrinology* 142:4900-4909.
- Cheng GA, Uetani N, Simoncic PD, Chaubey VP, Lee-Loy A, McGlade CJ, Kennedy BP, Tremblay ML. 2002. Attenuation of leptin action and regulation of obesity by protein tyrosine phosphatase 1B. *Dev Cell* 2:497-503.
- Dennis JE, Merriam A, Awadallah A, Yoo JU, Johnstone B, Caplan AI. 1999. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *J Bone Min Res* 14:700-709.
- Diradourian C, Girard J, Pégrier J.P. 2005. Phosphorylation of PPARs: From molecular characterization to physiological relevance *Biochimie* 87:33-38.
- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. 1997. *Osf2/Cbfa1*: A transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89:747-754.
- Forsen L, Meyer HE, Midthjell K, Edna TH. 1999. Diabetes mellitus and the incidence of hip fracture: Results from the Nord-Trøndelag Health Survey. *Diabetologia* 42: 920-925.
- Gordeladze JO, Drevon CA, Syversen U, Reseland JE. 2002. Leptin stimulates human osteoblastic cell proliferation, de novo collagen synthesis, and mineralization: impact on differentiation markers, apoptosis, and osteoclastic signaling. *J Cell Biochem* 85:825-836.
- Hamrick MW, Della-Fera MA, Choi YH, Pennington C, Hartzell D, Baile CA. 2005. Leptin treatment induces loss of bone marrow adipocytes and increases bone formation

- in leptin-deficient ob/ob mice. *J Bone Miner Res* 20:994-1001.
- Hess R, Pino AM, Ríos S, Fernández M, Rodríguez JP. 2005. High affinity leptin receptors are present in human mesenchymal stem cells (MSCs) derived from control and osteoporotic donors. *J Cell Biochem* 94:50-57.
- Holloway WR, Collier FMcL, Aitken CJ, Myers DE, Hodge JM, Malakellis M, Gough TJ, Collier GR, Nicholson GC. 2002. Leptin inhibits osteoclast generation. *J Bone Min Res* 17:200-209.
- Hu E, Kim JB, Sarraf P, Spiegelman BM. 1996. Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPAR γ 2. *Science* 274:2100-2103.
- Imbeault P, Vidal H, Tremblay A, Vega N, Nadeau A, Després J-P, Maurieu P. 2001. Age-related differences in messenger ribonucleic acid expression of key proteins involved in adipose cell differentiation and metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 86:828-833.
- Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. 1997. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 64:295-312.
- Jilka RL, Weinstein RS, Takahashi K, Parfitt AM, Manolagas SC. 1996. Linkage of decreased bone mass with impaired osteoblastogenesis in a murine model of accelerated senescence. *J Clin Invest* 97:1732-1740.
- Kallen CB, Lazar MA. 1996. Antidiabetic thiazolidinedione inhibit leptin (ob) gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5793-5796.
- Karsenty G. 2001. Leptin control bone formation through a hypothalamic relay. *Rec Prog Horm Res* 56:401-415.
- Kersten S, Desvergne B, Wahli W. 2000. Roles of PPARs in health and disease. *Nature* 405:421-424.
- Kim GS, Hong JS, Kim SW, Koh J-M, An CS, Choi J-Y, Cheng SL. 2003. Leptin induces apoptosis via ERK/cPLA2/cytochrome c pathway in human bone marrow stromal cells. *J Biol Chem* 278:21920-21929.
- Laharrague P, Larrouy D, Fontanilles AM, Truel N, Campfield A, Tenenbaum R, Galitzky J, Corberand JX, Penicaud L, Casteilla L. 1998. High expression of leptin by human bone marrow adipocytes. *FASEB J* 12:747-752.
- Lecka-Czernik B, Gubrij I, Moerman EA, Kajkenova O, Lipschitz DA, Manolagas SC, Jilka RL. 1999. Inhibition of *Osf2/Cbfa1* expression and terminal osteoblast differentiation by PPAR- γ 2. *J Cell Biochem* 74:357-371.
- Mangelsdorf DJ, Evans RM. 1995. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83:841-850.
- Mazziotti G, Angeli A, Bilezikian JP, Canalis E, Giustina A. 2006. Glucocorticoid-induced osteoporosis: An update. *Trends Endocrinol Metab* 17:144-149.
- Meunier P, Aaron J, Edouard C, Vignon G. 1971. Osteoporosis and the replacement of cell populations of the marrow by adipose tissue. A quantitative study of 84 iliac bone biopsies. *Clin Orthop Relat Res* 80:147-154.
- Nuttall ME, Patton AJ, Olivera DL, Nadeau DP, Gowen M. 1998. Human trabecular bone cells are able to express both osteoblastic and adipocytic phenotype: Implications for osteopenic disorders. *J Bone Min Res* 13:371-382.
- Patel NG, Holder JC, Smith SA, Kumar S, Eggo MC. 2003. Differential regulation of lipogenesis and leptin production by independent signaling pathways and rosiglitazone during human adipocyte differentiation. *Diabetes* 52:43-50.
- Pino AM, Rodríguez JM, Ríos S, Astudillo P, Leiva L, Seitz G, Fernández M, Rodríguez JP. 2006. Aromatase activity of human mesenchymal stem cells is stimulated by early differentiation, vitamin D and leptin. *J Endocrinol* 191:715-725.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147.
- Raisz LG. 1997. The osteoporosis revolution. *Ann Int Med* 126:458-462.
- Reginato MJ, Krakow SL, Bailey ST, Lazar MA. 1998. Prostaglandins promote and block adipogenesis through opposing effects on peroxisome proliferators-activated receptor gamma. *J Biol Chem* 273:1855-1858.
- Reseland JE, Syversen U, Bakke I, Qvigstad G, Eide LG, Hjertner O, Gordeladze JO, Drevon CA. 2001. Leptin is expressed in and secreted from primary cultures of human osteoblasts and promotes bone mineralization. *J Bone Min Res* 16:1426-1433.
- Rodríguez JP, Garat S, Gajardo H, Pino AM, Seitz G. 1999. Abnormal osteogenesis in osteoporotic patients is reflected by altered mesenchymal stem cells dynamics. *J Cell Biochem* 75:414-423.
- Rodríguez JP, Montecinos L, Ríos S, Reyes P, Martínez J. 2000. Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients produce a type I collagen-deficient extracellular matrix favoring the adipogenic differentiation. *J Cell Biochem* 79:557-565.
- Rosen CJ, Bouxsein ML. 2006. Mechanisms of disease: Is osteoporosis the obesity of bone? *Nat Clin Pract Rheumatol* 2:35-43.
- Rosen ED, Spiegelman BM. 2001. PPAR γ : A nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J Biol Chem* 276:37731-37734.
- Sabatakos G, Sims NA, Chen J, Aoki K, Kelz MB, Amling M, Bouali Y, Mukhopadhyay K, Fort K, Nestler EJ, Baron R. 2000. Overexpression of DeltaFosB transcription factor(s) increases bone formation and inhibits adipogenesis. *Nat Med* 6:985-990.
- Takahashi Y, Okimura Y, Mizuno I, Iida K, Takahashi T, Kaji H, Abe H, Chihara K. 1997. Leptin induce mitogen-activated protein kinase-dependent proliferation of C3H10T1/2 cells. *J Biol Chem* 272:12897-12900.
- Tartaglia LA. 1997. The leptin receptor. *J Biol Chem* 272:6093-6096.
- Thomas T, Burguera B. 2002. Is leptin the link between fat and bone mass? *J Bone Min Res* 17:1563-1569.
- Thomas T, Gori F, Khosla S, Jensen MD, Burguera B, Riggs BL. 1999. Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinology* 140:1630-1638.
- Thomas T, Burguera B, Melton LJ III, Atkinson EJ, Riggs BL, Khosla S. 2000. Relationship of serum leptin levels with body composition, sex steroid, and insulin levels in men and women. *Metabolism* 49:1278-1284.
- Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. 1994. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79:1147-1156.
- Unger RH. 2003. Lipid overload and overflow: Metabolic trauma and the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab* 14:398-403.

- Verma S, Rajaratnam JH, Denyon J, Hoyland JA, Byers RJ. 2002. Adipocytic proportion of bone marrow is inversely related to bone formation in osteoporosis. *J Clin Pathol* 55:693-698.
- Waite KJ, Floyd ZE, Arbour-Reily P, Stephens JM. 2001. Interferon- γ -induced regulation of peroxisome proliferators-activated receptor γ and STATs in adipocytes. *J Biol Chem* 276:7062-7068.
- Wang M-y, Orci L, Ravazzola M, Unger HR. 2005. Fat storage in adipocytes requires inactivation of leptin's paracrine activity: Implications for treatment of human obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:18011-18016.
- Zabolotny JM, Bence-Hanulec KK, Stricker-Krongrad A, Haj F, Wang Y, Minokoshi Y, Kim YB, Elmquist JK, Tartaglia LA, Kahn BB, Neel BG. 2002. PTP-1B regulates leptin signal transduction in vivo. *Dev Cell* 2:489-495.
- Zayzafoon M, Gathings WE, McDonald JM. 2004. Modeled microgravity inhibits osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells and increases adipogenesis. *Endocrinology* 145:2421-2432.