



“ESTUDIO DE FACTORES QUE PARTICIPAN EN LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMÁTICAS (MSCs) EN LA OSTEOPOROSIS”

Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

RODRIGO ANDRÉS HESS MICHELINI

Dr. Juan Pablo Rodríguez Vives
Director de Memoria de Título

Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Dra. María Rosa Bono Merino
Presidente Comisión

Dr. Christian González Billault

Dr. Marco Tulio Nuñez González
Prof. Patrocinante



Santiago de Chile, 11 Septiembre 2004



UCH-FC
Biotecnología
H586
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**ESTUDIO DE FACTORES QUE PARTICIPAN EN LA DIFERENCIACIÓN DE
LAS CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMÁTICAS (MSCs) EN LA
OSTEOPOROSIS**



Memoria de Título
Entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al Título de
Ingeniero en Biotecnología Molecular

por
Rodrigo Andrés Hess Michelini
Agosto, 2004
Santiago – Chile

Director de Tesis: Dr. Juan Pablo Rodríguez.
Laboratorio Biología Celular, INTA.
Profesor patrocinante: Dr. Tulio Núñez.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanos, por el apoyo y cariño brindado en todo momento. A mi director de tesis, Dr. Juan Pablo Rodríguez, por su excelente disposición y constante ayuda durante todo el desarrollo de esta tesis. A mis compañeros y amigos de laboratorio, Susana, Daniela, Mónica, Javier, Pato, Juan Pablo, José y Nicolás, por hacer de mi estadía como tesista una experiencia inolvidable, y a Felicita por su buena voluntad. A mis amigos de la "U", especialmente Eduardo, Feñas, Tomás, Rafa y Raúl por todas las experiencias vividas en estos años que sin duda me convirtieron en una mejor persona. Muy especialmente a Kathy, por su amor incondicional en estos años y su presencia constante a mi lado, para que no bajara los brazos en ningún momento. En fin, para todas aquellas personas que de una u otra manera hicieron posible que esta tesis llegara a buen término.



ÍNDICE DE MATERIAS



RESUMEN	xiii
ABSTRACT	x
INTRODUCCIÓN	1
Que es la Osteoporosis	1
Hipótesis	12
Objetivo general	12
Objetivos específicos	12
MATERIALES Y MÉTODOS	14
Selección de las Donantes	14
Obtención y purificación de MSCs	17
Cultivo de MSCs y ensayo de CFU-F	18
- Cultivo de MSCs	18
- Ensayo de CFU-F	18
Criopreservación	20
Diferenciación Adipogénica	20
Diferenciación Osteogénica	22
Efecto de leptina sobre la diferenciación osteogénica y adipogénica de MSCs	22
Determinación del receptor de leptina asociado a la membrana de MSCs	23
Efecto de BMP-2 sobre la diferenciación osteogénica de MSC	23
Western Blot	24

Immunofluorescencia	
- Receptores de BMP	25
RESULTADOS	26
Donantes	26
Obtención y cultivo de MSCs	27
Adipogénesis <i>in vitro</i>	29
Ensayo de CFU-F	31
Potencial de diferenciación de las CFU-F	33
Efecto de Leptina sobre la diferenciación de MSCs	34
Determinación de la presencia del receptor de leptina asociado a membrana en las MSCs	37
Efecto de BMP sobre la diferenciación de MSCs	41
Determinación de los receptores tipo I para BMP en MSCs	42
Factores de transcripción	44
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIONES	61
BIBLIOGRAFÍA	62
ANEXO	68



Índice de Tablas

1. Niveles de Densidad Mineral Ósea	16
2. Características de las donantes	26
3. Clasificación de las donantes	27
4. Diferenciación a Adipocitos	31
5. Potencial de diferenciación de las colonias	34
6. Capacidad de unión de leptina	39



Índice de Figuras



1. Homeostasis del hueso	1
2. Plasticidad de las MSCs	2
3. Citometría de flujo para adipocitos	21
4. MSCs provenientes de donantes controles y osteoporóticas	28
5. Adipogénesis de MSCs <i>in vitro</i>	30
6. Número de colonias	32
7. Efecto de leptina sobre la diferenciación osteogénica de MSCs	35
8. Efecto de leptina sobre la diferenciación adipogénica de MSCs	36
9. Capacidad de unión de ^{125}I -leptina en el transcurso de la diferenciación	38
10. Curva de desplazamiento	40
11. Efecto de BMP-2 sobre la diferenciación osteogénica de MSCs	41
12. Inmunofluorescencias para los receptores de BMP tipo I	42
13. Determinación de los factores de transcripción durante el transcurso de la diferenciación	45
14. Resumen de los resultados	54

Lista de Abreviaturas

BMPs	Proteínas morfogenéticas del hueso
BSA	Albúmina de suero bovino
Cbfa1	Core binding factor a1
CFU-F	Unidades formadoras de colonias de fibroblastos
CFU-GM	Células troncales hematopoyéticas
CO ₂	Dióxido de Carbono
DEXA	Absorciometría de doble energía radiológica
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMO	Densidad mineral ósea
DMSO	Dimetil Sulfóxido
ECL	Reacción de quimioluminiscencia
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
HCl	Ácido Clorhídrico
IBMX	Isobutil-metil-xantina
MAP quinasa	mitogen activated protein kinase
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MSCs	Células troncales mesenquimáticas
NaOH	Hidróxido de Sodio
OB-R	Receptores de leptina
PAGE	Electroforésis en geles de acrilamida
PBS	Tampón fosfato salino
PPARs	Peroxisome proliferator-activated receptors
RIPA	Buffer de lisis
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato de Sodio
SFB	Suero fetal bovino
TBS	Tampón tris salino

RESUMEN

La osteoporosis postmenopáusica es una patología que se caracteriza por una disminución de la masa ósea, producto del desbalance entre la resorción y la formación del hueso (Manolagas, 2000). La formación del tejido óseo es producida por los osteoblastos, los cuales derivan de las células troncales mesenquimáticas (MSCs) presentes en la médula ósea y otros tejidos (Minguell y col, 2000). En el último tiempo, se han realizado múltiples esfuerzos para dilucidar el origen y las causas de la osteoporosis, sin embargo, aun no se conocen con exactitud los mecanismos involucrados en la patogénesis de la enfermedad. Dado que las MSCs poseen también la capacidad de dar origen a adipocitos, en estos últimos años se ha planteado la “teoría lipídica de la osteoporosis” (Parhami y col, 1999). Esta teoría propone que en la osteoporosis se produce una disminución de la formación de células osteogénicas concomitante con un aumento de tejido adiposo en la médula ósea. En esta tesis estudiamos algunos factores que pudiesen alterar los procesos de diferenciación de las MSCs en estos dos grupos de mujeres. Para esto, aislamos MSCs de médula ósea provenientes de dos grupos de donantes; mujeres postmenopáusicas osteoporóticas y mujeres postmenopáusicas controles.

Los resultados muestran que las MSCs provenientes de donantes osteoporóticas presentan una capacidad de diferenciación adipogénica 3 veces mayor que las de donantes controles; esto se explica en parte por diferencias en los potenciales de diferenciación de cada uno de los progenitores presentes en la médula ósea, más que por diferencias en el número de progenitores. Además, las MSCs de donantes osteoporóticas

y controles responden de distinta manera frente a leptina y BMP-2, estimulando en ambos casos la diferenciación osteogénica. Sin embargo, leptina produce efectos en la diferenciación adipogénica sólo en MSCs provenientes de donantes controles, en donde se observa una disminución significativa del número de adipocitos. El estímulo de diferenciación osteogénico y adipogénico a su vez aumenta de manera significativa la capacidad de unión de leptina en MSCs en ambos tipos de donantes, aun cuando las MSCs provenientes de donantes osteoporóticas muestran una capacidad de unión de leptina menor que las controles. Los receptores tipo IA de BMP no presentan cambios de intensidad ni de distribución en ambos tipos de donantes, a diferencia de los receptores tipo IB, donde se observan cambios en su distribución en la membrana celular. La expresión de *Cbfa1* en células provenientes de ambos tipos de donantes es constitutiva y no cambia significativamente en el transcurso de la diferenciación. Para el caso de *PPAR γ* se ve que hay un aumento en la expresión de este factor, observándose una intensidad mayor y más sostenida en células osteoporóticas.

En conclusión, las MSCs provenientes de donantes osteoporóticas poseen una capacidad de diferenciación adipogénica mayor a la de donantes controles, lo cual en parte se debe tanto a diferencias en los potenciales de diferenciación de los progenitores presentes en la médula ósea como también a la respuesta diferencial de estos progenitores frente a estímulos como leptina y BMP-2.

Los factores estudiados en esta tesis pueden ser de mucha utilidad en el diseño de nuevas terapias que ayuden a rebajar los altísimos costos que genera la osteoporosis.

ABSTRACT

Postmenopausal osteoporosis is a pathology characterized by loss of bone mass, as a result of an imbalance between bone resorption and bone formation (Manolagas, 2000). Bone tissue formation is generated by osteoblasts, which derived from Mesenchymal Stem Cells (MSCs) present in bone marrow and other tissues (Minguell et al, 2000). In the last time many efforts have been done to elucidate the origin and causes of osteoporosis eventhough it remains unclear which are exactly the mechanisms involved in the pathogenesis of this disease. In fact, because MSCs have also the capacity to differentiate to adipocytes, in last years has emerged the "lipid theory of osteoporosis" (Parhamy et al, 1999). This theory proposes that in osteoporosis, formation of osteoblast cells decreases while simultaneously adipose tissue increases in the bone marrow. In this thesis we studied some factors that would change the dynamic of differentiation of MSCs in both postmenopausal women groups. For this purpose, we isolated MSCs from bone marrow coming of two groups of donors: one of osteoporotic women and the other one of control women.

The results show that MSCs taken from osteoporotic donors show an adipogenic differentiation ability three times higher than MSCs derived from the control donors; it is explained partially by differences in the differentiation potentials of each one of the mesenchymal progenitor cells presents in the bone marrow, rather than by differences in the number of these progenitor cells. Furthermore, MSCs from both osteoporotic and control donors, respond in a different way to leptin and BMP-2, stimulating in both cases the osteogenic differentiation. However, leptin exerts some effects in adipogenic

differentiation only on MSCs coming from control donors where it is observed the notoriously decrease in the number of adipocytes. The stimulus of osteogenic and adipogenic differentiation, also increase the potential of binding leptin on MSCs in both donors, though MSCs from osteoporotic donors show lower ability of binding leptin than the control donors. BMP type IA receptors do not change intensity nor distribution in both group of donors, versus receptors IB where changes are observed in their distribution on cell membrane. The expression of Cbfa1 in both osteoporotic and control cells it is constitutive and do not change during the differentiation process. For PPAR γ the observation shows an increase in the expression of this factor, being of a higher intensity and more sustained in osteoporotic cells.

In conclusion, MSCs from osteoporotic donors have a higher capacity of adipogenic differentiation than the control donors, which in part is due not only to differences in the potential of differentiation of the mesenchymal stem cells in the bone marrow, also to the differential response of these progenitor cells when exposed to stimulus as leptin and BMP-2.

The factors studied in this thesis could be useful for further investigations on therapies to help diminishing the high costs generated by the treatment of osteoporosis.

INTRODUCCIÓN

La osteoporosis postmenopáusica es una patología que afecta a un número cada vez mayor de mujeres tanto en Chile como en el resto del mundo y que se caracteriza por una disminución de la masa ósea. Se ha propuesto que la disminución de la masa ósea se produce por un desbalance entre la resorción y la formación del hueso por una excesiva osteoclastogénesis y una inadecuada osteoblastogénesis (Manolagas, 2000) (Figura 1). Este desbalance produce una pérdida de masa ósea, lo que conlleva a un aumento en la fragilidad del hueso. Esta pérdida de masa ósea aumenta la susceptibilidad de sufrir fracturas originando discapacidad y morbilidad en personas mayores, con el consiguiente gasto en salud. En el último tiempo se han realizado múltiples esfuerzos para dilucidar el origen y las causas de la osteoporosis, sin embargo, en la actualidad no se conocen con exactitud los mecanismos involucrados en la patogénesis de la enfermedad.

Figura 1: Homeostasis del hueso

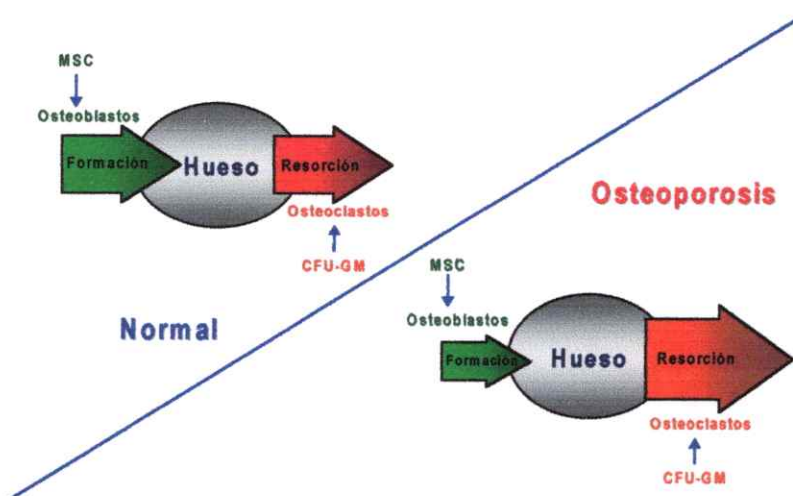


Figura 1. Procesos de formación y resorción ósea en condiciones normales y durante la osteoporosis. MSC (célula troncal mesenquimática); CFU-GM (célula troncal hematopoyética).

En condiciones normales el tejido óseo, al igual que otros tejidos, se encuentra en constante recambio (Figura 1). Mientras la resorción ósea es producida por la acción de los osteoclastos (células que derivan de células troncales hematopoyéticas), la formación del tejido óseo es producida por los osteoblastos, los cuales derivan de las células troncales mesenquimáticas (MSCs) presentes en la médula ósea y otros tejidos (Minguell y col, 2000). Las MSCs son células pluripotentes con la capacidad de autorrenovarse y que se pueden diferenciar a distintos fenotipos celulares: osteoblastos, adipocitos, condrocitos, células de estroma de médula ósea, entre otros, los cuales dan origen a diferentes tejidos: hueso, tejido adiposo, cartílago, estroma de médula ósea, y otros tejidos conectivos (Caplan, 1991) (Figura 2). El proceso de diferenciación ocurre a través de etapas discretas, durante las cuales se produce una pérdida creciente del potencial de diferenciación y un aumento de su compromiso hacia los distintos linajes celulares.

Figura 2: Plasticidad de las MSCs

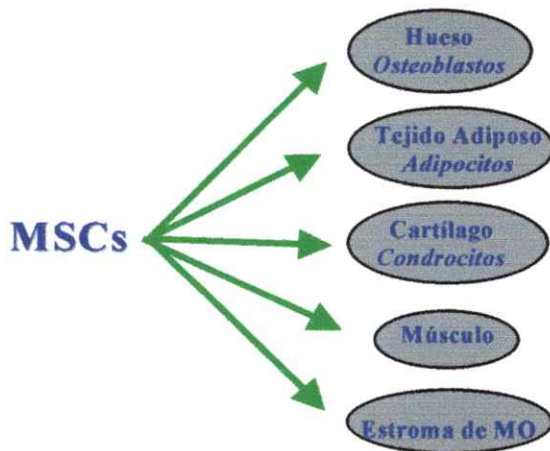


Figura 2. Capacidad de diferenciación de las MSCs a distintos fenotipos celulares.

La formación de hueso involucra la proliferación de células progenitoras pluripotentes (MSCs), su diferenciación hacia células progenitoras osteogénicas, migración de estas células a la superficie del hueso y su diferenciación hacia osteoblastos. (Long y col, 1995; Lecanda y col, 1997). Los procesos de formación y resorción ósea son finamente regulados por factores locales y sistémicos (hormonas - GH, PTH, estrógenos, vitamina D -, factores de crecimiento -BMPs, TGF- β , IGF-I, IGF-II, FGF -, citoquinas - IL-1, IL-6 -), con el fin de mantener constante la masa ósea. Ya que las células progenitoras del hueso presentes en la médula ósea poseen una gran plasticidad, se acepta cada vez más que cambios en ciertas propiedades funcionales de éstas células, como por ejemplo su capacidad de diferenciación, podrían explicar los defectos en la formación del hueso que se observan en ciertas patologías óseas. Hasta ahora, sólo existían evidencias indirectas que sugerían que alteraciones en la regulación de las diferentes vías de diferenciación de las MSCs podrían ser importantes en la génesis de algunos desórdenes óseos (Gimble y col, 1996; Nuttall y col, 1998). Ya que las MSCs que dan origen a los osteoblastos poseen a su vez la capacidad de dar origen a adipocitos, en estos últimos años se ha planteado la “teoría lipídica de la osteoporosis” (Parhami y col, 1999). Esta teoría propone que en la osteoporosis se produce una disminución de la formación de células osteogénicas concomitante con un aumento de tejido adiposo en la médula ósea.

Las primeras observaciones histomorfométricas sugieren que en la osteoporosis, el cambio de la dinámica de las células óseas es la consecuencia del reemplazo de la población de células funcionales de la médula ósea por tejido adiposo (Nuttall y col,

1998). Estudios clínicos posteriores mostraron que el aumento del tejido adiposo observado en la médula ósea de pacientes osteoporóticas se encuentra asociado con una disminución del número de células del linaje osteogénico. Este aumento en el número de adipocitos presentes en la médula ósea se ha observado en todas las condiciones que conducen a una pérdida de la masa ósea, tales como ovariectomía, inmovilización o tratamiento con glucocorticoides (Nuttall y col, 1998; Nuttall y Gimble, 2000).

Esta característica del hueso osteoporótico ha sido avalada por observaciones clínicas que indican la existencia de una correlación entre la aparición de grasa en la médula ósea y una capacidad reducida de formar hueso sugiriendo la existencia de una relación inversa entre adipocitos y osteoblastos (Gimble y col, 1996). Ya que tanto los osteoblastos como los adipocitos provienen de un precursor común y por ende pueden ser regulados en forma conjunta, los hallazgos mencionados sugieren que, en la osteoporosis, el compromiso de las MSCs hacia la vía de diferenciación adipogénica ocurriría a expensas del número de osteoblastos y de la función osteogénica (Gimble y col, 1996; Parhami y col, 1999).

Resultados obtenidos *in vitro* apoyan los datos clínicos que muestran un aumento del tejido adiposo en la médula de pacientes osteoporóticas. Así, resultados obtenidos en nuestro laboratorio (Rodríguez y col, 2000) muestran que MSCs obtenidas de pacientes osteoporóticas sintetizan una matriz extracelular deficiente en colágeno tipo I, lo cual favorece la diferenciación de estas células hacia el linaje adipogénico. Sin embargo, hasta ahora no se conocen con exactitud los mecanismos celulares y moleculares que dan cuenta de este hecho. Por lo tanto, el estudio de los mecanismos y factores

involucrados en la determinación del fenotipo celular maduro, osteoblasto o adipocito, es de gran importancia para comprender la patogénesis de la enfermedad.

Se sabe que numerosos factores, incluyendo hormonas, factores de crecimiento, citoquinas y factores de transcripción, por nombrar algunos, están involucrados en la regulación de la proliferación y diferenciación de las células progenitoras hacia los fenotipos osteogénicos y/o adipogénicos. Dentro de estos factores nos interesa estudiar el rol que tienen leptina (Thomas y col, 1999) y las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs) (Kadiyala y col, 1997) en la diferenciación de las MSCs en condiciones normales y de osteoporosis; y la expresión y activación de los factores de transcripción: PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors) (Mandrup y Lane, 1997; Dani, 1999; Wu y col, 1999) y Cbfa1 (core binding factor a1) (Shapiro, 1999; Komori y col, 1997), característicos de las vías de diferenciación adipogénica y osteogénica, respectivamente.

Dentro de los muchos factores asociados con la osteoporosis, el sobrepeso de los individuos es relevante. Diversos estudios clínicos demuestran que masa ósea y contenido graso se encuentran estrechamente relacionados (Thomas y col, 1999). De hecho se ha visto que en la menopausia mujeres con exceso de peso se encuentran más protegidas contra la osteoporosis que aquellas mujeres de peso normal o bajo peso (Odabasi y col, 2000; Goulding y Taylor, 1998; Karsenty, 2001). Aunque los niveles plasmáticos de leptina, una proteína secretada por las células adiposas, se encuentran aumentados en la obesidad, no se ha encontrado una relación directa entre niveles plasmáticos de leptina y densidad mineral ósea, aunque estudios *in vitro* muestran que leptina actúa sobre las células de estroma de médula ósea aumentando su diferenciación

hacia osteoblastos e inhibiendo su diferenciación a adipocitos (Thomas y col, 1999). Leptina es una proteína de 16 kDa secretada por las células adiposas que regula la ingesta de alimentos y el gasto de energía a nivel del hipotálamo para mantener el peso corporal estable. Por esta razón se propuso a la leptina como un factor anti-obesidad envuelto directamente en un feedback entre adipocitos e hipotálamo (Zhang y col, 1994).

Parece interesante entonces estudiar el efecto que tiene leptina sobre los procesos osteogénicos y adipogénicos, aunque los datos existentes hasta ahora parecen paradójales. Mientras se ha observado un efecto protector de la obesidad sobre la osteoporosis (Considine y col, 1996; Thomas y col, 2000), no se ha encontrado una relación directa entre los niveles plasmáticos de leptina y la masa ósea (Thomas y Burguera, 2002). Sin embargo, se ha observado que células progenitoras de médula ósea cultivadas en presencia de estímulos adipogénicos se diferencian hacia adipocitos y durante la diferenciación expresan y secretan altos niveles de leptina (Laharrague y col, 1998). Aunque los sitios precisos de acción de la leptina no son bien conocidos, se cree que sus efectos son mediados vía hipotálamo (Karsenty, 2001). Sin embargo, la amplia expresión del receptor de leptina en diferentes tejidos sugiere que leptina también podría actuar directamente en tejidos periféricos (Tartaglia, 1997; Reseland y col, 2001; Holloway y col, 2002). Como resultado de splicing alternativo en el mRNA, existen tres isoformas del receptor de leptina con diferentes longitudes y secuencias C-terminal (Barr y col, 1999; Kielar y col, 1998; Ghilardi y col, 1996); un receptor de membrana con un dominio citoplasmático corto sin función de transducción de señales, un receptor de membrana con un dominio citoplasmático largo con la habilidad de transducir señales, y

un supuesto receptor de leptina soluble (Chen y col, 1996; Lee y col, 1996). Los receptores de leptina (OB-R) de cadena corta y larga han sido encontrados en células óseas o sus precursores (Reseland y col, 2001; Thomas y col, 1999; Kim y col, 2003; Glauber y col, 1995). Se han visto variaciones en los contenidos de OB-R dependiendo del origen celular y la etapa de diferenciación (Thomas y col, 1999; Siegrist-Kaiser y col, 1997; Glasow y col, 2001) pero la cantidad de proteína OB-R no ha sido medida en forma cuantitativa.

De acuerdo con los datos reportados en la literatura, leptina no tendría un efecto a nivel del compromiso de las células progenitoras a diferenciarse, sino que su efecto sería aumentando la maduración osteogénica e inhibiendo la maduración tardía de los adipocitos (Thomas y col, 1999). Se ha observado que leptina aumenta la actividad de MAP quinasa (Mitogen Activated Protein kinase) (Takahashi y col, 1997), lo cual ha servido para establecer una relación entre MAP quinasa y adipogénesis. La activación de MAP quinasa, mediada por leptina, fosforila PPAR γ lo cual resulta en la disminución de su actividad transcripcional (Jaiswal y col, 2000). Todos estos datos apoyan la hipótesis que leptina es un regulador fisiológico de las vías de diferenciación osteogénicas y adipogénicas.

Por otra parte, se ha observado que las BMPs estimulan la actividad osteogénica de las MSCs, e inhiben el proceso adipogénico (Gimble y col, 1995). Las BMPs, que fueron originalmente identificadas como péptidos que inducían la formación de cartilago y hueso *in vivo*, juegan un rol importante en la formación y en la diferenciación de células de hueso, y son componentes integrales de la matriz extracelular de este tejido

(Chen y col, 1997). Las BMPs se expresan muy tempranamente durante la diferenciación osteogénica, lo cual sugiere que la diferenciación puede ser el resultado de la producción de BMP y de su subsecuente acción autocrina (Wright y col, 1998). BMP-2 inhibe la proliferación induciendo la diferenciación de progenitores óseos humanos a células maduras, aumentando la expresión de las proteínas de la matriz del hueso y promoviendo su mineralización (Lecanda y col, 1997). Esto se corrobora en MSCs a las cuales se les ha incorporado el gen para BMP-2 y producen la proteína, tienen aumentada la actividad de la fosfatasa alcalina, inducen la mineralización de la matriz, y son capaces de generar hueso *in vivo* (Wright y col, 1998).

En esta misma línea, el análisis del rol que tienen los receptores de BMP (tipo IA y IB) en el proceso de diferenciación muestra que estos receptores transmiten señales diferentes a la célula progenitora y por lo tanto juegan un rol clave en el compromiso y diferenciación a osteoblastos y adipocitos (Chen y col, 1998). Los receptores de BMP son miembros de la familia de receptores TGF- β , los cuales inician su acción por la unión de dos tipos de serina/treonina kinasa de transmembrana, conocidos como receptores I y II. Aunque tanto los receptores de tipo I como los de tipo II se unen a su ligando BMP, heteromeros de receptores tipo I y tipo II se requieren para que la señal sea transducida (Massague, 1998). El compromiso hacia osteoblastos o adipocitos puede ser especificado bloqueando o activando selectivamente la señal de los receptores tipo IA y IB para BMP. Esto sugiere que la adquisición o pérdida temporal de un subtipo del receptor de BMP en células precursoras puede ser una etapa clave para el compromiso de las células y su posterior diferenciación hacia osteoblastos o adipocitos.

Tomando en cuenta la participación que tienen las BMPs en los procesos de diferenciación, el uso terapéutico potencial de BMPs en el manejo de enfermedades óseas hace importante estudiar las respuestas de MSCs frente a este tipo de moléculas (Lecanda y col, 1997).

Los procesos de diferenciación de las MSCs hacia el linaje osteogénico y adipogénico involucran la expresión específica de genes asociados a cada fenotipo: Cbfa1, gen maestro regulador de la expresión génica de los osteoblastos, y PPARs (δ y γ), genes maestros para la adipogénesis. El factor de transcripción Cbfa1 se expresa sólo en osteoblastos y se ha visto en animales de experimentación que una delección en el gen provoca la pérdida de la capacidad de formación de hueso (Shapiro, 1999; Komori y col, 1997). La región del promotor de genes característicos de osteoblastos (osteopontina, osteocalcina, y sialoproteína del hueso) contiene secuencias de unión para Cbfa1, y su unión estimula la diferenciación a osteoblastos (Harada y col, 1999). Por otra parte, se sabe que la sobre expresión de PPAR γ induce la diferenciación a adipocitos (Nanbu-Wakao y col, 2000). La activación de PPAR δ por ácidos grasos induce la transcripción de genes que codifican para proteínas involucradas en el metabolismo lipídico y PPAR γ , lo cual demuestra que la expresión de PPAR γ es controlada por PPAR δ . Esto significa que PPAR δ se expresa durante las etapas iniciales del proceso de diferenciación adipogénica y PPAR γ lo hace en las etapas tardías, promoviendo fuertemente la diferenciación terminal a adipocitos (Saladin y col, 1999; Bastie y col, 1999). Por otra parte, se ha demostrado que existe una relación entre los factores de transcripción característicos de la adipogénesis (PPAR γ 2) y osteogénesis (Cbfa1). Así, resultados en

la literatura sugieren que PPAR γ 2 regula negativamente la plasticidad de las células de estroma suprimiendo la expresión de Cbfa1, junto con una disminución de la síntesis de colágeno tipo I, fosfatasa alcalina y osteocalcina, moléculas producidas por osteoblastos (Lecka-Czernick y col, 1999).

En esta tesis, MSCs aisladas desde muestras de médula ósea provenientes de donantes normales y osteoporóticas, serán mantenidas en cultivo en condiciones basales y de diferenciación osteogénicas y adipogénicas, y sometidas a los distintos factores en estudio con el fin de determinar el rol que estos cumplen en la diferenciación de las MSCs. También, se determinará el número de progenitores presentes en la médula ósea de ambos tipos de donantes y se evaluará el potencial de diferenciación de cada uno de estos. Por último, se determinará la expresión de los factores de transcripción involucrados en la diferenciación de las MSCs hacia osteoblastos y adipocitos.

Los resultados que se obtengan en este proyecto se sumarán a los obtenidos previamente en este laboratorio y que apuntan a demostrar de manera más directa que las células progenitoras en la médula ósea de pacientes con osteoporosis postmenopáusia se diferencian preferentemente hacia adipocitos. Estas evidencias obtenidas *in vitro* contribuirán a apoyar la teoría lipídica de la osteoporosis, la cual es sustentada hasta ahora principalmente sobre la base de observaciones histomorfométricas y de datos clínicos.

Conocer los factores que participan en la regulación de las vías de diferenciación (Bennett y col, 1991) y sus mecanismos de acción en condiciones normales y patológicas (osteoporosis), ayudará a comprender el origen en la enfermedad y por lo

tanto, permitirá intervenir dichos procesos, de forma de poder inhibir específicamente el proceso de la adipogénesis conjuntamente con activar el proceso osteogénico. Así, la inhibición de la adipogénesis en la médula en paralelo con un aumento en la osteogénesis puede representar una aproximación terapéutica novedosa para el tratamiento de las enfermedades osteopénicas relacionadas con la edad y para la osteoporosis postmenopáusica (Nuttall y col, 1998; Nuttall y Gimble, 2000). Una terapia como ésta usada sola o en conjunto con agentes antiresorptivos, puede ser más eficaz en la prevención o tratamiento de desórdenes osteopénicos.

Hipótesis

“Durante la osteoporosis, la diferenciación preferencial de las MSCs hacia la línea adipogénica puede ser explicada tanto por diferencias en el número y capacidad de diferenciación de las células progenitoras, como también por la respuesta de estos progenitores ante determinados factores reguladores”

Objetivos Generales

Determinar el rol de los progenitores mesenquimáticos y estudiar el rol de leptina y BMPs en la diferenciación de las MSCs hacia osteoblastos y/o adipocitos, en muestras obtenidas de pacientes normales y osteoporóticas.

Objetivos Específicos

- 1- Cuantificar la presencia de progenitores presentes en la médula ósea proveniente de donantes sanos y con osteoporosis postmenopáusicas.
- 2- Determinar el potencial de diferenciación de cada uno de estos progenitores.
- 3- Estudiar el efecto que tiene leptina en la diferenciación osteogénica y adipogénica de MSCs provenientes de donantes normales y osteoporóticas.
- 4- Estudiar el efecto que tiene BMP-2 en la diferenciación osteogénica de MSCs provenientes de donantes normales y osteoporóticas.
- 5- Estudiar el rol que tienen los receptores de membrana tipo I para BMPs y de leptina en la diferenciación osteogénica y adipogénica de las MSCs provenientes de donantes normales y osteoporóticas.

6- Determinar la presencia de los factores de transcripción Cbfa1 y PPAR gama en la diferenciación osteogénica y adipogénica de las MSCs provenientes de donantes normales y osteoporóticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de las Donantes.

Las donantes que participaron en este estudio fueron seleccionadas de acuerdo a los siguientes criterios de selección; 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 de cualquiera otra que pudiera afectar al tejido óseo.

Todas las donantes fueron pacientes de sexo femenino, portadoras de fractura de cadera o de algún miembro inferior, sin ninguna enfermedad ósea asociada, que ingresaron al Servicio de Ortopedia y Traumatología del Hospital Sótero del Río, para someterse a cirugía como parte del tratamiento habitual utilizado para estos casos. A cada una de las potenciales donantes, se les solicitó su autorización informada para la obtención de una muestra durante el procedimiento quirúrgico. Previamente, el médico tratante le explicó a cada paciente que la toma de muestra consistiría en una aspiración de médula ósea (10 ml) a nivel de la cresta iliaca en el momento de la intervención quirúrgica, que la obtención de esta muestra no implicaba un riesgo para la potencial donante, que no se extraería una cantidad de tejido mayor que la estrictamente necesaria y que su negativa para ser donante no tendría ningún efecto en el tratamiento médico que debía recibir. Se adjunta copia de la autorización del comité de ética del INTA y del Hospital Sótero del Río; además, de una copia de la autorización que debe firmar cada una de las pacientes (ver anexo).

Del total de potenciales donantes, se seleccionaron aquellas mujeres postmenopáusicas que estuvieran en el rango de edad entre los 60 y 85 años, que no presentaran patologías asociadas a osteoporosis y que no estuvieran bajo tratamiento de reemplazo hormonal.

A todas las donantes se les midió los valores de densidad mineral ósea (D.M.O.), mediante densitometría ósea y, de manera complementaria, algunos parámetros bioquímicos con el fin de descartar otras patologías relacionadas. Utilizando el parámetro estadístico T-score, el cual se define como la relación de D.M.O. (g/cm^2) del paciente con respecto al promedio de D.M.O. que tiene un individuo joven normal de 21 años, fue posible el diagnóstico de osteoporosis. Este parámetro, además de establecer el "riesgo de fractura", ha permitido estratificar la población de acuerdo al nivel de D.M.O. del paciente (según la O.M.S., 1994). De acuerdo con esta estratificación, la población se puede agrupar en cuatro diferentes estratos de acuerdo a la densidad mineral ósea del paciente con respecto al joven adulto normal.

Como se muestra en la Tabla 1, el grupo normal o control corresponde al grupo de pacientes con un promedio de D.M.O. menor de -1 desviación estándar (D.S.) respecto al promedio de D.M.O. del adulto joven normal de 21 años. El grupo de pacientes que tienen un promedio de D.M.O. respecto de un individuo joven normal que se encuentra en el rango de -1 a $-2,5$ D.S. corresponde a pacientes que presentan cierto grado de osteopenia. El grupo que presenta una desviación estándar con respecto al promedio de D.M.O. del adulto joven normal que sobrepasa los valores de $-2,5$ D.S., se considera un grupo de pacientes que tienen osteoporosis, la cual si además es

acompañada por episodios de fracturas frecuentes, se considera severa (Gajardo H., 1997).

Tabla 1: Niveles de Densidad Mineral Ósea (O.M.S. de 1994)

ESTRATOS	DIAGNÓSTICO	T-SCORE
1	Normal	Masa ósea mayor de -1,0 D.S. del valor joven adulto normal.
2	Osteopenia	Masa ósea entre -1 a -2,5 D.S. del valor joven adulto normal.
3	Osteoporosis	Masa ósea menor de -2,5 D.S. del valor joven adulto normal.
4	Osteoporosis severa	Masa ósea menor de -2,5 D.S. del valor joven adulto normal con una o más fracturas.

Los valores de D.M.O. se obtuvieron usando el método de absorciometría de doble energía radiológica (DEXA), en el laboratorio de densitometría del INTA.

Este método permite obtener la D.M.O. en columna lumbar y cadera, dos sitios del esqueleto axial de gran importancia biológica puesto que presentan frecuentes episodios de fractura. Como estandarización de este método se estableció la medición de D.M.O. a nivel de L₂-L₄ por ser las vértebras que presentan menor posibilidad de interferencias con estructuras adyacentes. A nivel de cadera, las regiones que siempre se examinan son el cuello femoral, trocanter y triángulo de Ward (región central distal del cuello femoral) (32). En esta tesis, la D.M.O. se midió a nivel de columna (L₂-L₄), cadera y cuerpo total. Para esto, se utilizó un densitómetro (Lunar DPX-L, Software 1.3z, Lunar Corp, Madison, WI, USA), el cual presentó una exactitud de un 98 a 99% y un error de reproducibilidad del 1 a 2%.

Obtención y purificación de MSCs.

Las MSCs se aislaron desde las muestras de médula ósea de acuerdo con el procedimiento descrito por Jaiswal y colaboradores (1997). Brevemente, a 10 ml de aspirado de médula ósea se le agregan 20 ml de Dulbecco's Modified Eagles Medium, DMEM (Sigma, St. Louis, MO, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco BRL). Esta mezcla se centrifugó para colectar las células y descartar la capa grasa presente en la muestra. Posteriormente, las células colectadas se resuspendieron en 10 ml de DMEM suplementado con 10% SFB, penicilina-estreptomicina (100 ug/ml) y gentamicina (80 ug/ml) (medio de cultivo basal) y se fraccionaron en una gradiente de densidad de Percoll al 70% (Sigma). La gradiente se centrifugó a 1600 r.p.m. por 15 minutos formándose tres fracciones, la fracción superior (1,03 gr/ml), la fracción media (1,10 gr/ml) y la fracción inferior (1,14 gr/ml). De estas tres fracciones se colectó la fracción superior o de menor densidad, donde se encuentran mayoritariamente las MSCs.

En la fracción más liviana de la gradiente se encuentra una población heterogénea de células, la cual se usa para establecer los cultivos primarios y para realizar los ensayos de unidades formadoras de colonias (CFU-F). Para esto, las células se lavaron tres veces y se resuspendieron en medio de cultivo basal. Una parte de la suspensión celular se reserva para cultivo primario ($1-2 \times 10^7$ células mononucleadas/placa 100 mm) y otra parte (2×10^6 células/placa 35 mm) se reserva para realizar el ensayo de CFU-F.

Cultivo de MSCs y ensayo de unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F).

Cultivo de MSCs

Las células se sembraron a una densidad de $1-2 \times 10^7$ células mononucleadas/placa 100 mm (Nunc, Naperville, IL, USA) en 8 ml de medio de cultivo basal. Las células se cultivan a 37°C en una atmósfera humedecida en 5% de CO_2 . Después de cuatro días de cultivo, el medio de cultivo junto con las células que no se adhirieron a la placa de cultivo, fue removido y se reemplazó por medio de cultivo basal fresco. Estos cultivos se denominan cultivos primarios. El medio de cultivo se reemplaza por medio fresco cada 4 días.

Cuando las células alcanzan la confluencia, las células se liberan de la placa mediante un tratamiento suave con una solución de tripsina al 0.25% / EDTA, durante 5 minutos a 37°C . Las células liberadas mediante este tratamiento, se contaron en un hemocitómetro, luego de lo cual se sembraron a 1/3 de densidad para continuar con el siguiente pasaje (primer subcultivo). Este procedimiento se repite tres veces hasta alcanzar el cuarto subcultivo. Los experimentos descritos en esta tesis se llevaron a cabo después del cuarto subcultivo, donde la población de MSCs es homogénea.

Ensayo de CFU-F

Con el objeto de comparar el número de progenitores presentes en la médula ósea de donantes controles y osteoporóticas, y determinar el potencial de diferenciación de cada uno de ellos, se realizó el ensayo de CFU-F. Para este ensayo, las células se cultivaron a una densidad celular baja, de manera que las colonias tengan un origen

clonal, es decir, provengan de una misma célula. Para esto, células aisladas mediante la gradiente de Percoll (2×10^6 células mononucleadas) se sembraron en placas de 60 mm (Nunc) en 3 ml de medio DMEM suplementado con 20% de SFB y se cultivaron a 37°C en una atmósfera humedecida en 5% de CO₂. A las 72 horas de cultivo, se retiraron las células no adheridas y se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco. Después de 12 días de cultivo, se contó el número de colonias formadas, y las colonias se liberaron individualmente de la placa de cultivo mediante un tratamiento suave con tripsina al 0,25% / EDTA y se sembraron en placas de 48 well. Al finalizar el segundo subcultivo, las colonias se liberaron desde la placa de cultivo mediante un tratamiento suave con tripsina y cada una de ellas se sembraron en 4 pocillos en placas de 48 well. Después de alcanzada la confluencia, el medio de cultivo fue reemplazado por medio de diferenciación osteogénico o adipogénico según corresponda (más adelante se entregan detalles de cada uno de estos medios). Luego de catorce días de diferenciación, se analiza el depósito de calcio y el número de adipocitos formados como marcadores de diferenciación osteogénica y adipogénica, respectivamente. El depósito de calcio se evidencia mediante la tinción de las colonias con Alizarin Red o tinción Von Kossa (Parhami, 1999). La presencia de adipocitos, se evidencia mediante la tinción con Oil Red (Nuttall y col, 1998). Las colonias se clasifican como positivas para uno u otro linaje cuando se observa que sobre el 70-80% del área de la placa o el 70-80% de las células presentes en la placa de cultivo se tiñen con el colorante específico. La tinción de las colonias se observa bajo el microscopio y los resultados (colonias positivas y negativas) son tabulados.

Criopreservación.

Con el objeto de mantener un banco de células obtenidas de muestras de médula ósea humana provenientes de ambos tipos de donantes, las MSCs son criopreservadas. Para ésto, luego del segundo subcultivo las MSCs se liberan desde la placa de cultivo con un tratamiento suave de tripsina, tal como se mencionó anteriormente, son lavadas con medio de cultivo basal y resuspendidas en una solución de criopreservación fría, 90% SFB y 10% dimetilsulfóxido (DMSO, Gibco BRL, Sigma). Las células (1×10^6 células) suspendidas en 1 ml de la solución de criopreservación se colocaron en viales de criopreservación (Nalgene Brand products), se congelan mediante un descenso gradual de la temperatura hasta -196°C y luego son almacenadas en nitrógeno líquido.

Las MSCs criopreservadas luego de ser descongeladas, mostraron la misma viabilidad y funcionalidad celular que las células frescas. Por esta razón, en esta tesis fue posible utilizar indistintamente células frescas o criopreservadas, ya que los resultados que se obtienen en ambas condiciones son comparables.

Diferenciación Adipogénica.

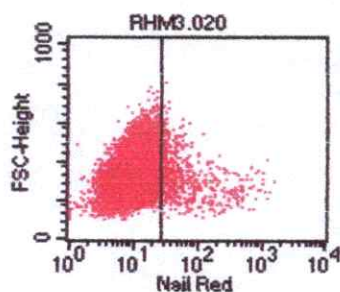
Las MSCs obtenidas desde donantes controles y osteoporóticas fueron ensayadas para medir su potencial adipogénico mediante la cuantificación, por citometría de flujo, de la cantidad de adipocitos acumulados luego de cultivarlas en condiciones de diferenciación adipogénica. Para ésto, las células ($2,5 \times 10^4$ células/pocillo, placa 24 well, Nunc) obtenidas de ambos tipos de donantes se cultivaron en medio de cultivo adipogénico (AS) consistente en medio basal suplementado con dexametasona $1 \mu\text{M}$,

insulina 10µg/ml, isobutilmetilxantina (IBMX) 100 µg/ml e indometacina 100 µM. El medio de cultivo se reemplaza por medio fresco cada cuatro días.

Después de 14 días de cultivo, las células se liberaron de la placa de cultivo mediante un tratamiento suave con tripsina (0.25% / EDTA, 5 minutos a 37°C), después de lo cual las células se contaron en un hemocitómetro y se ajustaron a una concentración de 1×10^6 células/ml. Las células se incuban con Nile Red (1µg/ml) por 30 minutos y se analizan mediante citometría de flujo (Figura 3) con el fin de determinar el porcentaje de adipocitos presentes en la muestra (Dennis et al., 1999).

Figura 3: Citometría de Flujo

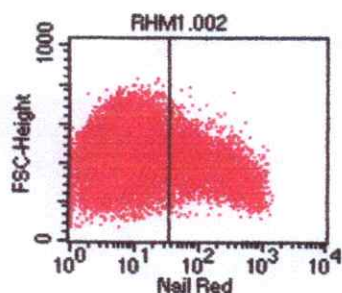
A



File: RHM3.020
Gate: G1
Total Events: 10000
Y Parameter: FSC-H FSC-Height (L

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	8471	92.77	84.71
UR	660	7.23	6.60

B



File: RHM1.002
Gate: G1
Total Events: 19935
Y Parameter: FSC-H FSC-Height (L

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	14026	79.38	70.36
UR	3643	20.62	18.27
LL	0	0.00	0.00
LR	0	0.00	0.00

Figura 3. La figura muestra una citometría de flujo representativa de la determinación del porcentaje de adipocitos generados a partir de MSCs provenientes de donantes controles (A) y donantes osteoporóticas (B).

Diferenciación Osteogénica.

Las MSC obtenidas a partir de donantes controles y osteoporóticas fueron ensayadas para medir su potencial osteogénico. Para ésto, las células ($2,5 \times 10^4$ células/pocillo, placa 24 well, Nunc) obtenidas a partir de ambos tipos de donantes se cultivaron en medio de cultivo osteogénico (OS) que consiste en medio de cultivo basal suplementado con dexametasona 100 nM, β -glicerofosfato 10 mM y 50 μ g/ml de ácido ascórbico preparado y adicionado diariamente. El medio de cultivo se reemplaza por medio fresco cada cuatro días.

La capacidad de las células para diferenciarse hacia osteoblastos se determinó midiendo la cantidad de calcio depositado en la matriz, como marcador de diferenciación. Después de 14 días de cultivo, los cristales de fosfato de calcio depositados en la capa celular se solubilizaron usando una solución de HCl 0,5N y la cantidad de calcio solubilizado se midió por espectrometría de absorción atómica a 423nm (Atomic Absorption Spectrophotometer 2280, Perkin-Elmer) (Rodríguez et al, 2002).

Efecto de leptina sobre la diferenciación osteogénica y adipogénica de MSCs.

Para estudiar el efecto de leptina sobre la diferenciación osteogénica, las células ($2,5 \times 10^4$ células/pocillo, placa de 24 well) se cultivaron en medio OS sólo o suplementado con 1 μ g/ml de leptina recombinante humana (rh-leptina, Chemicon). Después de 14 días de cultivo, la cantidad de calcio depositado se midió por espectrometría de absorción atómica. Para determinar el efecto que tiene leptina sobre la

diferenciación adipogénica, las células ($2,5 \times 10^4$ células/pocillo, placa de 24 well) se cultivaron en medio AD sólo o suplementado con $1 \mu\text{g/ml}$ de rh-leptina. Después de 14 días de cultivo, el número de adipocitos se determinó por citometría de flujo como se indicó anteriormente.

Determinación del receptor de leptina asociado a la membrana de MSCs.

El receptor de leptina asociado a la membrana celular de MSCs se determinó utilizando ^{125}I -leptina (2200 Ci/mmol , NEN, Boston, MA, USA). Para esto, MSCs derivadas de donantes control y osteoporóticas fueron cultivadas en medio basal, OS o AD por 3 días. Después de esto, el medio de cultivo fue removido y la capa celular fue lavada tres veces con PBS 1X al 1% BSA (4°C) y luego incubada a 4°C en DMEM que contiene 50 pM de ^{125}I -leptina y 1% BSA (medio de unión). Las células fueron incubadas en el medio de unión en presencia o ausencia de leptina fría (sin marca) (Chemicon International Inc, Temecula, CA, USA) como competidor, durante cuatro horas a 4°C . Una vez finalizado el período de incubación, el medio de unión fue removido y la capa celular lavada tres veces con PBS al 1% BSA (4°C). Luego, las células fueron solubilizadas con una solución de NaOH 0.4N y la ^{125}I -leptina fue medida en un contador gama (Packard, Downers Grove, IL, USA) (Liu et al, 1997).

Efecto de BMP-2 sobre la diferenciación osteogénica de MSC.

Para determinar el efecto de BMP-2 sobre la diferenciación osteogénica, las células ($2,5 \times 10^4$ células/pocillo, 24wells dish Nunc) se cultivan en medio OS sólo o suplementado con 50 ng/ml de BMP-2 recombinante humana (R&D Systems,

Minneapolis, USA or Wyeth). Después de 11 días de cultivo, se mide la cantidad de calcio depositado por espectroscopía de absorción atómica.

Western Blot

Las proteínas obtenidas mediante lisis celular con buffer de lisis RIPA (tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 20 mM, triton X-100 1%, dioxicolato de Na 1% y SDS 0,1%), se incubaron por 5 minutos a 100°C en buffer de carga (SDS 2%, glicerol 10%, tris 0.06 M pH 6.8, azul de bromofenol 0.01%) con β -mercaptoetanol al 4%, para luego ser separadas en un gel SDS-PAGE al 10%. Las proteínas separadas en el gel se transfirieron electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa (BioRad, USA), la cual se incubó por 30 minutos en un buffer de bloqueo (solución de leche descremada al 4% en TBS/tween 0,05%). Luego, la membrana se incubó con el primer anticuerpo (rabbit anti-cbfa1, dilución 1:100 y mouse anti-PPAR gamma, dilución 1:1000) durante toda la noche a 4°C. La membrana se lava tres veces con TBS/tween 0,05% y enseguida se incubó durante 1 hora con el segundo anticuerpo (anti-rabbit y anti-mouse conjugados a peroxidasa a una dilución de 1:5000). La inmunoreactividad se determina utilizando la reacción de quimioluminiscencia ECL (Amersham Pharmacia Biotech). Con el fin de realizar una determinación cuantitativa, la intensidad de cada banda se transforma en un valor digital, para lo cual se utiliza un scanner (Snapscan1212, Agfa) y la versión digitalizada se analiza mediante el software Kodak Digital 1D image.

Inmunofluorescencia.

Receptores de BMP

Las células de ambos tipos de donantes se cultivan en cubre objetos de vidrio bajo condiciones de diferenciación osteogénica y adipogénica para determinar los niveles de expresión de los receptores tipo I para BMP. Los cubre objetos de vidrio con las células adheridas se lavaron dos veces con PBS 1X, luego de lo cual se fijaron con paraformaldehído 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después las células se lavaron tres veces con PBS 1X y se bloquearon con TBS 3% BSA durante 30 minutos. Posteriormente, las células se lavaron tres veces con PBS 1X, se incubaron con el primer anticuerpo (rabbit anti- ALK3 y rabbit anti-ALK6, dilución 1:100) a 4°C durante toda la noche y luego con el segundo anticuerpo (anti-rabbit FIT C, dilución 1:250) a 37°C durante una hora, previo lavado con PBS 1x. Las células se observaron bajo el microscopio de fluorescencia con el filtro correspondiente para el segundo anticuerpo.

RESULTADOS

Donantes.

Las muestras de médula ósea se obtuvieron de un grupo de donantes que cumplían con los criterios de inclusión establecidos para este estudio y que fueron detallados en Materiales y Métodos.

A todas las potenciales donantes, junto con realizárseles una densitometría ósea, se les midieron ciertos patrones bioquímicos con el propósito de descartar aquellas donantes que mostraran patrones alterados que dieran cuenta de enfermedades asociadas. Los resultados de las donantes seleccionadas para los estudios presentados en esta tesis, se observan en la tabla 2.

Tabla 2: Características de las donantes

Edad	T-score	Diag.	VHS	Calcemia	Fosfemia	Fosf. Alc.	GOT	GPT	N. Ureico	Creatinina	Calciuria	TSH
			mm/h	mg/dL	mg/dL	U/L	U/L	U/L	mg/dL	mg/dL	mg/24 Hrs	uUI/ml
71	(-0.9)	N	28	10,0	3,7	92	29	20	14	0,73	116	1,55
77	0,3	N	22	10,7	3,9	98	20	16	17	1,07	115	1,26
65	(-1.7)	N	16	10,0	4,2	119	31	25	23	0,83	124	1,19
72	(-1.7)	N	19	10,9	3,2	133	26	26	22	1,24	118	2,42
72	(-2.1)	N	28	9,0	3,9	120	25	24	24	1,34	97	1,81
71,4	(-1,22)	5	23	10,1	3,8	112	26	22	20	1,04	114	1,65
70	(-3.2)	O	46	10,4	4,8	130	21	12	12	0,8	53	2,15
62	(-2.6)	O	30	9,1	4,1	155	14	18	18	0,71	147	1,77
75	(-2.9)	O	20	11,0	4,4	88	20	13	15	0,9	90	5,39
66	(-4.7)	O	37	11,0	2,9	199	37	21	21	0,62	119	2,45
86	(-3.4)	O	26	10,0	3,6	134	21	21	23	1,14	98	5,67
75	(-6.2)	O	10	8,0	3,3	97	23	27	20	0,35	139	1,06
72,3	(-3,83)	6	28	9,9	3,9	134	23	19	18	0,75	108	3,08

Tabla 2. En esta tabla se muestran los datos individuales y promedios (en negrita) de edad, valores de T-score, diagnóstico y número de donantes que participan en este estudio, junto con una completa caracterización de los parámetros bioquímicos obtenidos.

Después de corroborar con estos resultados que las donantes seleccionadas no presentan patrones bioquímicos asociados a enfermedades óseas y de acuerdo a los niveles de D.M.O. medidos, se les clasificó como donantes controles u osteoporóticas según la clasificación establecida en 1994 por la O.M.S.

Tabla 3: Clasificación de las donantes

Donantes	N	Edad Promedio	T-score Promedio	D.M.O. gr/cm ²
Controles	5	71,4 ± 4.28	-1,22 ± 0.95	1,057 ± 0.116
Osteoporóticas	6	72,3 ± 8.41	-3,83 ± 1.37	0,742 ± 0.164

Tabla 3. En esta tabla se muestran el número de donantes utilizadas en este estudio y su clasificación. También se muestran los promedios ± desviación estándar de edad, T-score y D.M.O. de las donantes. Las diferencias observadas en los valores promedio de T-score y de D.M.O. son significativas ($p < 0.05$).

En la tabla 3, se resumen algunas de las características principales de los grupos utilizados en este estudio. Se ve que la edad promedio es prácticamente la misma para ambos tipos de donantes y por lo tanto es un parámetro que no influye mayormente en los resultados obtenidos. Donde si se observan diferencias significativas es en los valores de T-score y D.M.O., lo cual se encuentra dentro de lo esperado. El número total de muestras utilizadas en este estudio proviene de 11 pacientes; 5 controles y 6 osteoporóticas.

Obtención y cultivo de MSCs.

La obtención y cultivo de las MSCs a partir de las muestras de médula ósea se efectuó de acuerdo al procedimiento descrito en Materiales y Métodos. En las condiciones utilizadas en este estudio, tanto las MSCs de donantes controles como

osteoporóticas son susceptibles de ser mantenidas en cultivo, adherirse a la placa de cultivo y proliferar formando una monocapa. Luego de 24 horas en cultivo, ambos tipos de células muestran niveles semejantes de adhesión a las placas de cultivo (alrededor de un 70% de adhesión de las células). La amplificación del número de células se logra a través de subcultivos sucesivos, durante los cuales se logra también aumentar el grado de homogeneidad de las células presentes en la placa de cultivo. Así, después del cuarto subcultivo, las células muestran un alto grado de homogeneidad con ausencia de células adipocíticas, cuboides, redondeadas o multinucleadas. Es por esta razón que los estudios presentados en esta tesis se realizan luego del 4° subcultivo. Las células forman una monocapa cuyas células presentan una morfología del tipo fibroblastoide. Sin embargo, al analizar los cultivos con mayor detenimiento se observa que la morfología de las MSCs provenientes de las donantes osteoporóticas difiere de las MSCs provenientes de donantes control (Figura 4), ya que son de mayor tamaño y menos alargadas.

Figura 4: MSCs provenientes de donantes controles y osteoporóticas

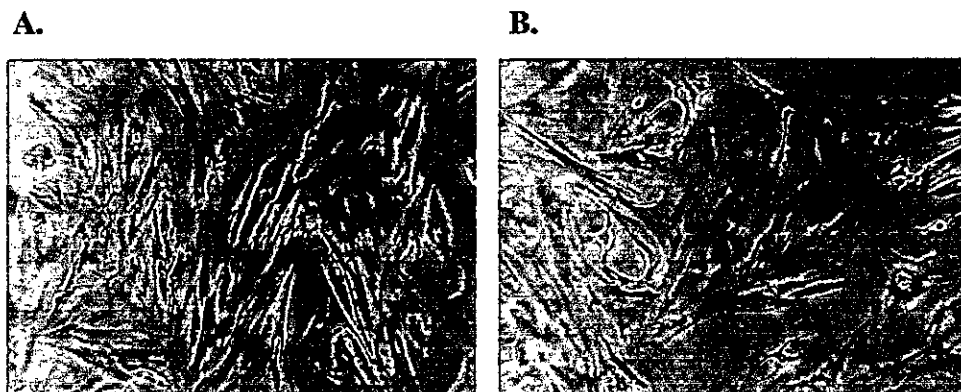


Figura 4. Fotografía microscopio de contraste de fases (10x) de cultivos de: MSCs provenientes de donantes controles (A) y MSCs provenientes de donantes osteoporóticas (B). Las células se encuentran en 4° subcultivo luego de 3 días de cultivo.

Tanto los cultivos de células obtenidas de donantes controles como de donantes osteoporóticas poseen la capacidad de proliferar *in vitro* hasta alcanzar confluencia, luego de lo cual el crecimiento de las MSCs se detiene por inhibición por contacto célula-célula. Trabajo previos (Rodríguez y col, 1999) han mostrado que las MSCs provenientes de donantes osteoporóticas presentan una velocidad de proliferación menor que las MSCs provenientes de donantes controles (datos no mostrados) y que el número de células presentes al final de cada subcultivo es siempre menor en cultivos de células provenientes de donantes osteoporóticas. El mayor tamaño de las células de donantes osteoporóticas puede explicar en parte la diferencia observada en el número de células con que se alcanza la confluencia.

Las MSCs obtenidas de donantes controles y osteoporóticas son capaces de diferenciarse *in vitro* hacia el linaje osteogénico o adipogénico, entre otros, dependiendo del estímulo de diferenciación que reciben. Esta capacidad de diferenciación está presente a través de los distintos subcultivos.

Adipogénesis *in vitro*.

Tal como se mencionó en la introducción (Nuttall y col, 1998), se ha postulado que las MSCs provenientes de pacientes osteoporóticas tendrían aumentado su potencial de diferenciación hacia el linaje adipogénico en desmedro de la vía osteogénica. Para corroborar esta observación se analizó la capacidad de diferenciación hacia el linaje adipogénico que tienen las MSCs provenientes de donantes control y osteoporóticas (Figura 5).

Figura 5: Adipogénesis de MSCs *in vitro*

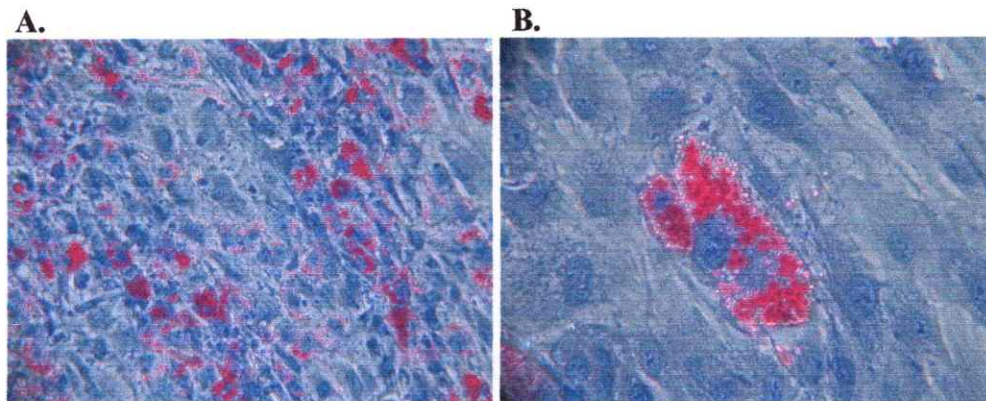


Figura 5. Fotografía microscopio de contraste de fases de MSCs provenientes de donantes osteoporóticas en la que se observa: A. Tinción con oil red donde se observan claramente en rojo los gránulos de grasa presentes (10x); B. Aspecto típico de un adipocito después de catorce días de diferenciación (40x).

Para analizar la capacidad que tienen las MSCs provenientes tanto de donantes controles como osteoporóticas para diferenciarse hacia el linaje adipogénico, las células se cultivaron en medio de cultivo adipogénico como se describió en Materiales y Métodos. Los resultados muestran que las MSCs provenientes de donantes osteoporóticas y de donantes controles, presentan una capacidad de diferenciación adipogénica diferente. Como se muestra en la tabla 4, la cantidad de adipocitos presentes en las muestras de pacientes osteoporóticas al final del período de cultivo es tres veces mayor que el número de adipocitos que se observa en muestras de donantes controles, lo cual concuerda con datos reportados anteriormente por este laboratorio (Rodríguez y col, 2000).

Tabla 4: Diferenciación a Adipocitos

	Nº Adipocitos (relativo)
Controles	1,0
Osteoporóticas	3,1 ± 1,1

Tabla 4. En esta tabla se muestra el número de adipocitos relativo, el cual se define como la razón entre el número de adipocitos en muestras de donantes osteoporóticas y el número de adipocitos en muestras de donantes controles.

Las diferencias observadas en la cantidad de adipocitos generados a partir de ambos tipos de muestras se pueden explicar por diferencias; a) en el número de progenitores presentes en la médula ósea, b) en la capacidad de diferenciación adipogénica de dichos progenitores o, c) en la respuesta de estos a distintas moléculas reguladoras. Con el objeto de dilucidar cual de las alternativas anteriores explica de mejor manera los resultados obtenidos, se diseñaron los experimentos siguientes.

Ensayo de unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F).

El ensayo de CFU-F permite cuantificar el número de progenitores presentes en las muestras de médula ósea tanto de donantes controles como osteoporóticas. Además, permite ensayar la capacidad de diferenciación hacia el linaje osteogénico y/o adipogénico que tienen los precursores.

Las células se mantienen en cultivos de baja densidad por doce días y luego se cuenta el número de colonias de progenitores formadas. Las colonias se liberan de la placa de cultivo individualmente, se mantienen en cultivo para amplificar el número de células de cada una de ellas y posteriormente se ensaya su capacidad de diferenciación hacia ambos linajes celulares. Los resultados obtenidos muestran que no existe una

diferencia significativa en el número de colonias presentes en cultivos de MSCs obtenidas de donantes controles y osteoporóticas: $12,7 \pm 5,6$ y $14,1 \pm 2,6$, respectivamente (Figura 6). Este resultado indica la existencia de un número similar de progenitores mesenquimáticos presentes en las muestras de médula ósea tanto de donantes controles como de donantes osteoporóticas. Este número corresponde a un porcentaje muy pequeño (0,01%) del total de células mononucleadas presentes en la médula ósea de ambos tipos de donantes. Aunque el número de colonias es similar en ambos tipos celulares, datos obtenidos anteriormente en este laboratorio mostraron que el número de células por colonia era mayor en las muestras provenientes de donantes controles que en las muestras provenientes de donantes osteoporóticas (Garat, 1999), lo cual se explica por la diferencia en la velocidad de proliferación observada en las MSCs provenientes de ambos grupos de donantes (Rodríguez y col, 1999).

Figura 6: Número de colonias

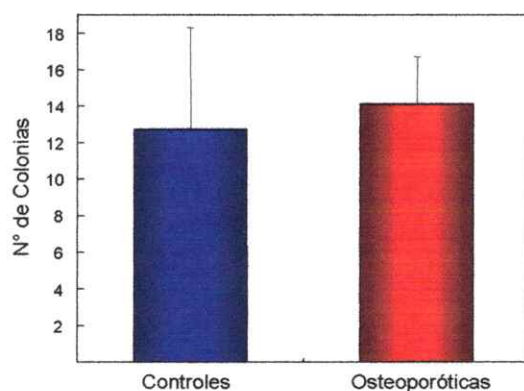


Figura 6. Gráfico que muestra el número de colonias obtenidas a partir de muestras provenientes de donantes controles (barra de color azul) y osteoporóticas (barra de color rojo). Los resultados se expresan como el promedio del número de colonias en cada una de las muestras \pm la desviación estándar. Los datos mostrados corresponden al total de muestras utilizadas en este estudio (11).

Determinación del potencial de diferenciación de las CFU-F

De acuerdo a los resultados presentados en la sección anterior, las diferencias observadas en la diferenciación adipogénica en muestras provenientes de donantes controles y osteoporóticas no pueden ser explicadas por el número de progenitores presentes en la médula ósea, ya que el número de progenitores presentes en la médula ósea resultó ser similar en ambos tipos de donantes. Por esto, nuestro siguiente objetivo fue evaluar el potencial de diferenciación de los progenitores presentes en la médula ósea de ambos tipos de donantes hacia los linajes osteogénicos y adipogénicos.

Las colonias liberadas individualmente de la placa de cultivo se amplifican hasta confluencia y luego se ensaya su capacidad para diferenciarse hacia cada uno de los linajes celulares mencionados, en presencia del estímulo de diferenciación específico. Los resultados que se muestran en la tabla 5, indican que el potencial de diferenciación de los progenitores hacia el linaje osteogénico y adipogénico es diferente en células provenientes de donantes controles y osteoporóticas. En las muestras provenientes de donantes controles se observa que los progenitores presentes en ellas muestran un claro predominio del potencial de diferenciación osteogénico (O) (45,1%), respecto al potencial adipogénico (A) (13,6%). Un 20,8% de los progenitores presenta la capacidad de diferenciación hacia ambos linajes (O/A), mientras el 22% no tiene capacidad de diferenciación (No) hacia los linajes ensayados en este estudio. En células provenientes de donantes osteoporóticas, se observa una disminución del potencial de diferenciación osteogénico (30%) acompañado de un aumento en el potencial de diferenciación adipogénico (30%) de los progenitores. En este tipo de muestras no se observan cambios

significativos en el porcentaje de progenitores que aparecen como bipotentes (O/A) y aquellos que no se diferencian (No).

Tabla 5: Potencial de diferenciación de las colonias

	O	A	O/A	No
	%	%	%	%
Controles	45,1 ± 6,7	13,6 ± 6,4	20,8 ± 4,2	22,0 ± 6,7
Osteoporóticas	30,0 ± 4,7	30,0 ± 14,1	16,7 ± 4,7	23,3 ± 4,7

Tabla 5. En esta tabla se muestra el porcentaje de colonias que se diferencian hacia uno u otro linaje; osteogénico (O), adipogénico (A), ambos (O/A) o que no se diferencian (N). Los valores corresponden a los porcentajes promedios ± su desviación estándar. Se analizaron tres muestras por donante en duplicado.

Además de las diferencias observadas en el potencial de diferenciación de las células progenitoras presentes en la médula ósea, se quiso determinar la manera como determinados factores regulatorios, más específicamente leptina y BMP, podrían influir sobre la diferenciación osteogénica y/o adipogénica de ambos tipos de células.

Efecto de Leptina sobre la diferenciación osteogénica y adipogénica de MSCs.

Para analizar el efecto de leptina sobre la diferenciación de las MSCs provenientes tanto de donantes controles y osteoporóticas, las células se cultivaron en medios de diferenciación suplementados con leptina tal como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados muestran que leptina produce un aumento similar en la diferenciación osteogénica en ambos tipos celulares. Así, mientras en muestras provenientes de donantes controles el aumento que produce la suplementación del medio de diferenciación osteogénico con leptina (1 ug/ml) es de alrededor de un 17%, en muestras de donantes osteoporóticas este aumento es alrededor de un 14% (figura 7). Sin

embargo, al comparar ambos tipos de donantes se observa una diferencia en los niveles de depósito de calcio, tanto en presencia como en ausencia de leptina, siendo mayor (casi el doble) en muestras provenientes de donantes controles.

Figura 7: Efecto de leptina sobre la diferenciación osteogénica de MSCs

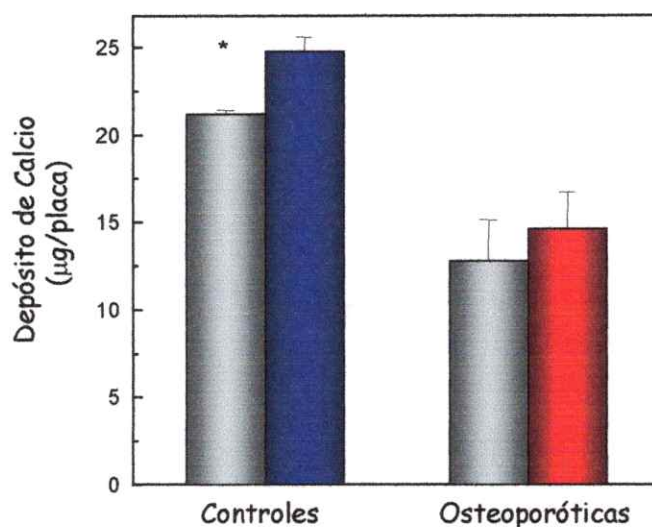


Figura 7. Los resultados se expresan como el calcio total depositado en microgramos, en presencia (barras azul y roja) o ausencia (barras grises) de leptina, por las células controles y osteoporóticas. La diferencia observada en donantes controles es significativa (*), al igual que la diferencia observada entre ambos tipos de donantes ($p < 0,05$).

Al analizar el efecto de leptina sobre la diferenciación adipogénica se observa una importante diferencia entre ambos tipos celulares. En células obtenidas de donantes controles la presencia de leptina produjo una disminución entre un 50-60% en el porcentaje de adipocitos presentes en la placa de cultivo. Sin embargo, en células provenientes de donantes osteoporóticas no se observan efectos significativos de leptina sobre el número de adipocitos. Es decir, en presencia y ausencia de leptina el porcentaje

de adipocitos es similar (22,3 y 21,9 respectivamente) (figura 8). El efecto diferencial que tiene leptina sobre la diferenciación adipogénica en células provenientes de donantes controles es estadísticamente significativo.

Figura 8: Efecto de leptina sobre la diferenciación adipogénica de MSCs

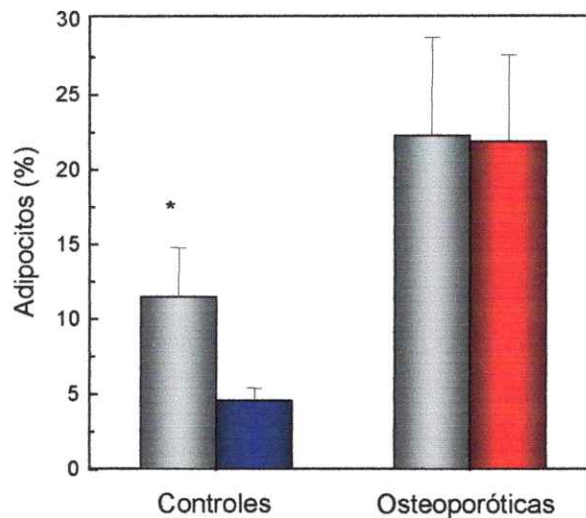


Figura 8. Los resultados se expresan como el porcentaje de adipocitos producidos, en presencia (barras azul y roja) o ausencia (barras grises) de leptina, por las células controles y osteoporóticas. La diferencia observada en donantes controles es significativa (*), al igual que la diferencia observada entre ambos tipos de donantes ($p < 0,05$).

El efecto diferencial de leptina sobre la diferenciación adipogénica sugiere que pudieran existir diferencias a nivel del receptor de leptina (número y/o afinidad) unido a la membrana plasmática o bien a nivel de las rutas de transducción de señales involucradas. Para esto, estudiamos los receptores de membrana para leptina asociados a las MSCs provenientes de ambos donantes.

Determinación de la presencia del receptor de leptina asociado a membrana en las MSCs.

Considerando que el receptor de leptina asociado a membrana en las MSCs debe jugar un rol fundamental en la respuesta específica de estas células y que no ha sido reportada su presencia en este tipo celular, en esta tesis estudiamos la capacidad de unión de la leptina a MSCs provenientes de pacientes controles y osteoporóticas, en condiciones basales y de diferenciación osteogénica y adipogénica. Los primeros resultados mostraron que los niveles del receptor de membrana para ambos tipos de donantes en condiciones basales de cultivo eran muy bajos y no presentaban diferencias significativas entre si. Sin embargo, cuando las células eran sometidas a estímulos de diferenciación osteogénicos incrementaban de manera importante su capacidad de unión a leptina con respecto a los valores basales. Por lo tanto, era importante cuantificar los cambios en los niveles del receptor de leptina en células a diferentes tiempos de cultivo en presencia de estímulos de diferenciación osteogénicos o adipogénicos. La figura 9 muestra la capacidad de unión de ^{125}I -leptina que tienen las MSCs provenientes de donantes normales y osteoporóticas a diferentes tiempos de cultivo en condiciones de diferenciación osteogénica y adipogénica. Los datos muestran que en condiciones basales de cultivo, la capacidad de unión de ^{125}I -leptina es muy baja y es similar para ambos tipos de células. Sin embargo, en condiciones de diferenciación osteogénica esta capacidad de unión se incrementa significativamente y este aumento depende del tiempo de diferenciación (figura 9A). Tanto en muestras provenientes de donantes controles como osteoporóticas, la máxima capacidad de unión se observa después de 3 días de cultivo en condiciones de diferenciación osteogénicas y es entre 1,5 a 2 veces mayor que

la unión observada al comienzo del período de diferenciación. Después del día 3 de cultivo, la capacidad de unión de ^{125}I -leptina decae progresivamente alcanzando los niveles basales alrededor del día 10 de cultivo.

Figura 9: Capacidad de unión de ^{125}I -leptina en el transcurso de la diferenciación

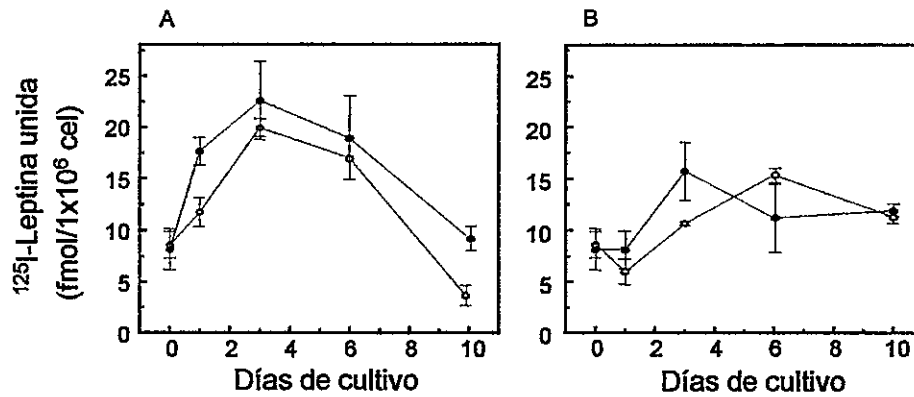


Figura 9. Unión de ^{125}I -leptina durante el transcurso de la diferenciación osteogénica (A) y adipogénica (B) de células provenientes de donantes controles (círculos rellenos) y osteoporóticas (círculos vacíos). Los datos se expresan como fmoles de ^{125}I -leptina unida por millón de células. Se analizaron tres muestras por donante en triplicado.

Es importante hacer notar que durante todo el período analizado la capacidad de unión de las MSCs provenientes de donantes controles fue siempre mayor que la capacidad de unión de las células obtenidas de donantes osteoporóticas. Las condiciones de cultivo adipogénicas también modifican la capacidad de unión de leptina en MSCs derivadas de donantes controles y osteoporóticas, pero el patrón de unión que se aprecia durante la diferenciación adipogénica es diferente al observado en la diferenciación osteogénica (Figura 9B). Así, aunque la capacidad de unión de leptina de las células control aumenta durante la diferenciación adipogénica, la variación máxima de unión es

menor que la observada en condiciones de diferenciación osteogénica (15,7 y 22,6, respectivamente). Al igual que lo observado para la diferenciación osteogénica, el valor máximo de unión se alcanza a los 3 días de diferenciación. Por otra parte, aunque al final del período de diferenciación adipogénica ensayado la capacidad de unión de leptina disminuye, los valores continúan siendo más altos que los observados en condiciones basales. Las células osteoporóticas muestran un incremento en su capacidad de unión de leptina similar a la observada en células controles, sin embargo el valor máximo de unión se alcanza en forma más tardía (día 6)(figura 9B). La tabla 6 resume la capacidad de unión de leptina de las MSCs provenientes tanto de donantes control como de donantes osteoporóticas a los tres días de diferenciación, tiempo de unión máxima en las células controles.

Tabla 6: Capacidad de unión de leptina

Condiciones de Cultivo	MSCs	
	Controles	Osteoporóticas
	(fmol/10 ⁶ cells)	
Basal	8.2 ± 1.8	8.6 ± 1.3
Osteogénico	22.6 ± 3.8 ^a	19.9 ± 0.9 ^a
Adipogénico	15.7 ± 2.0 ^{a,b}	10.7 ± 0.1 ^{a,c}

Tabla 6. Unión de leptina de donantes controles y osteoporóticas después de tres días de diferenciación osteogénica y adipogénica. Los resultados muestran significancia estadística al compararlos con: ^acondiciones basales; ^bMSCs osteoporóticas; ^ccondiciones osteogénicas.

Se ve que en condiciones de diferenciación las células osteoporóticas presentan menor unión a la leptina comparada con las células controles. Así, mientras en células controles la capacidad de unión de ¹²⁵I-leptina en células cultivadas en condiciones de

diferenciación osteogénica y adipogénica se incrementó 2,7 y 1,9 veces, respectivamente, comparadas con la capacidad de unión observada en condiciones basales; en las células osteoporóticas la capacidad de unión incrementa en 2,3 y 1,2 veces durante la diferenciación osteogénica y adipogénica, respectivamente, al ser comparadas con la unión en condiciones basales.

Por otro lado, se quiso determinar la especificidad de la unión de la leptina marcada con el receptor en ambos tipos de muestras. La leptina no marcada desplazó de manera dosis dependiente la unión de la ^{125}I -leptina a la monocapa celular de una forma monofásica. La unión de leptina mostró una alta afinidad comparativa ($\text{IC}_{50} = 0.4 \pm 0.09$ nM) y de igual magnitud en MSCs provenientes de donantes controles y provenientes de donantes osteoporóticas (Figura 10A y 10B).

Figura 10: Curva de desplazamiento

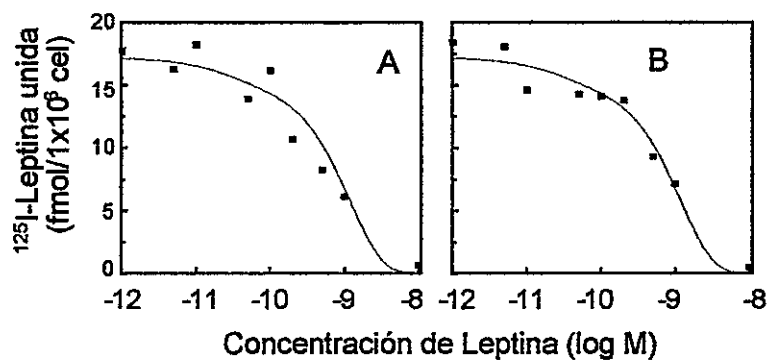


Figura 10. EL gráfico muestra la curva de desplazamiento para la unión de ^{125}I -leptina durante el transcurso de la diferenciación osteogénica de células provenientes de donantes controles (A) y osteoporóticas (B). Experimento representativo de una muestra por donante en duplicado.

Efecto de BMP sobre la diferenciación de MSCs.

Para analizar el efecto de BMP sobre la diferenciación osteogénica de las MSCs provenientes tanto de donantes controles como osteoporóticas, las células se cultivaron en medio de diferenciación suplementado o no con BMP-2 (50 ng/ml).

Tal como se mencionó, la diferenciación osteogénica se determinó por el depósito de calcio total luego de 12 días de diferenciación. Los resultados indican que la presencia de BMP-2 en el medio de diferenciación produce un aumento de la diferenciación osteogénica tanto en muestras provenientes de donantes controles como osteoporóticas. La magnitud de dicho aumento es similar en ambos tipos de donantes. Mientras en las células provenientes de donantes controles el aumento producido por BMP-2 es de alrededor de un 37%, en células obtenidas de donantes osteoporóticas este aumento alcanza un 33% (Figura 11).

Figura 11: Efecto de BMP-2 sobre la diferenciación osteogénica de MSCs

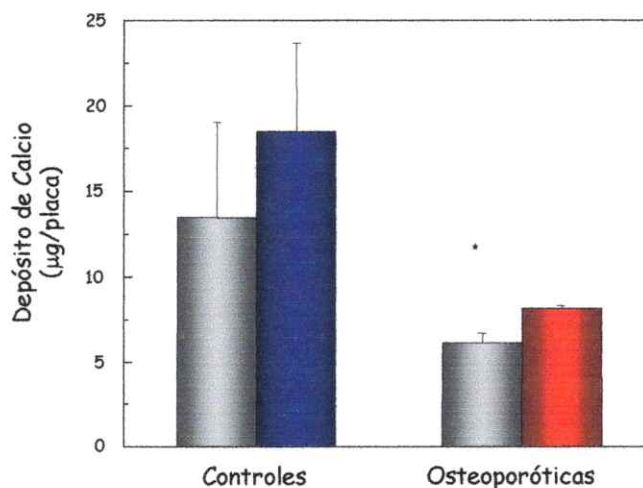


Figura 11. Los resultados se expresan como el calcio total depositado en miligramos, en presencia (barras azul y roja) o ausencia (barras grises) de BMP-2, por las células controles y osteoporóticas. La diferencia observada en donantes osteoporóticas es significativa (*) ($p < 0,05$).

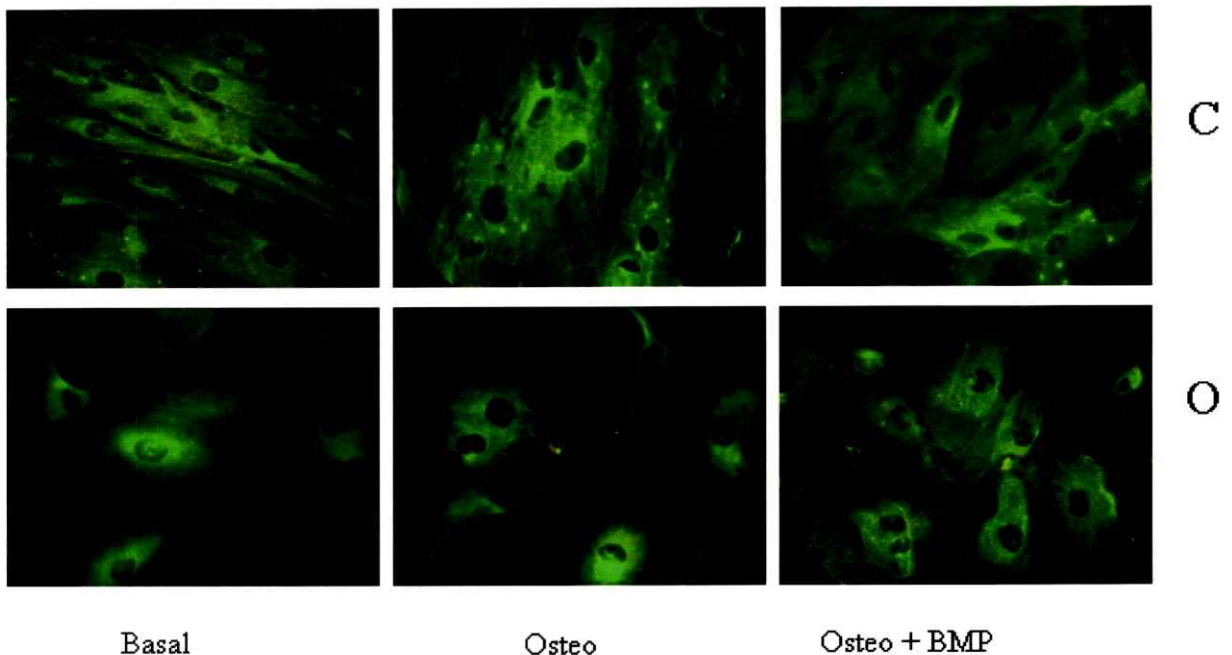
Determinación de los receptores tipo I para BMP en MSCs.

Ya que BMP-2 provoca un aumento en el depósito de calcio de magnitudes distintas entre una muestra y otra, se quiso ver de que manera los receptores tipo I para BMP podrían dar cuenta de estas diferencias. La determinación (identificación) de los receptores tipo I para BMP se realizó mediante ensayos de inmunofluorescencia. Los resultados se pueden observar en la figura 12.

Figura 12: Inmunofluorescencias para los receptores de BMP tipo I

A.

Receptor tipo I-A (ALK 3)



B.

Receptor tipo I-B (ALK 6)

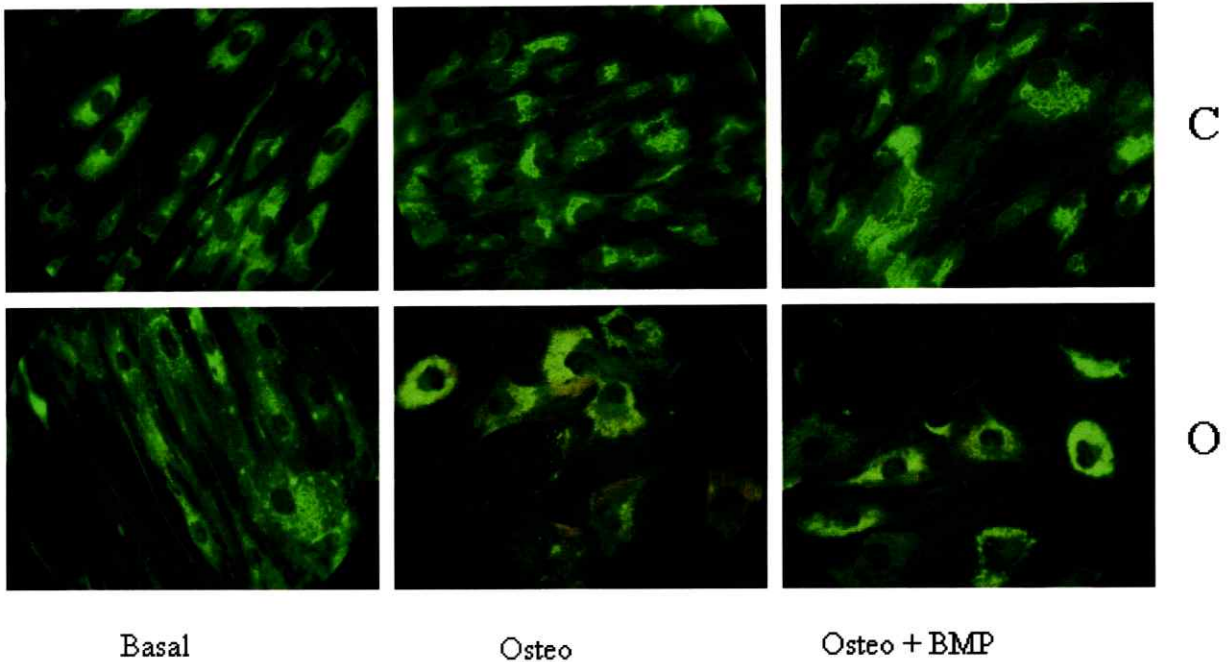


Figura 12. Las microfotografías de inmunofluorescencia muestran la distribución de los receptores para BMP tipo IA (A) y IB (B) en muestras provenientes tanto de donantes controles (C) como de donantes osteoporóticas (O), en condiciones basales y de diferenciación osteogénica de tres días, en ausencia o presencia de un estímulo con BMP-2.

Al analizar los resultados para el receptor de BMP tipo IA (ALK 3) en muestras provenientes de donantes controles, no se observan diferencias significativas en la expresión o en la distribución del receptor en las células cultivadas tanto en condiciones basales como en condiciones de diferenciación osteogénica, en presencia o no de BMP-2. Algo similar se aprecia para muestras las provenientes de donantes osteoporóticas, en donde tampoco se observan diferencias claras. Sin embargo, los resultados para el receptor de BMP tipo IB (ALK 6) son completamente distintos. Así, se puede ver que en muestras provenientes de donantes controles no se observan diferencias significativas en

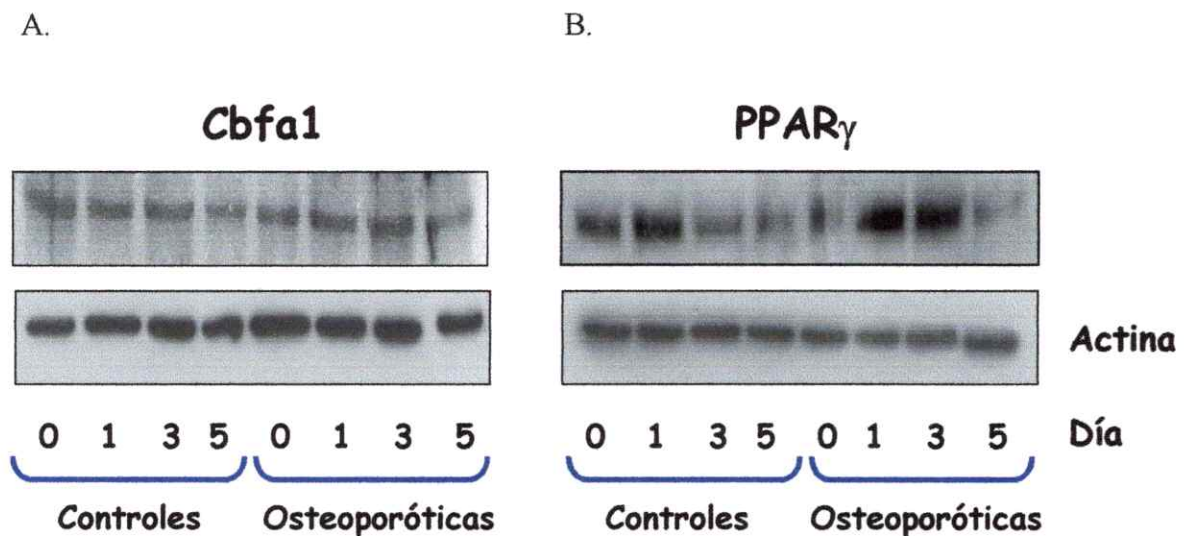
la intensidad de fluorescencia pero sí en la distribución del receptor. Esto queda de manifiesto al comparar las células en condiciones basales con aquellas bajo estímulo de diferenciación osteogénico con y sin BMP-2, donde se observa un cambio en la distribución del receptor, el cual se localiza en zonas específicas de la membrana. Algo similar se observa en muestras provenientes de donantes osteoporóticas, aunque en este último caso junto con un cambio de distribución también es posible apreciar un leve aumento en la intensidad del receptor. Al comparar las células en condiciones basales entre sí, no se observan diferencias importantes ni en la expresión ni la distribución del receptor en la membrana.

Factores de transcripción.

La determinación de los factores de transcripción Cbfa1 y PPAR γ en muestras provenientes tanto de donantes controles como de donantes osteoporóticas, se realizó tal como se describe en materiales y métodos. En la figura 13 se muestra un experimento representativo donde se cuantifica el Cbfa1 y el PPAR γ , con sus respectivos controles de actina, a diferentes tiempos de diferenciación osteogénica y adipogénica, respectivamente. En esta figura se observa que el nivel de expresión del Cbfa1 en condiciones basales no cambia significativamente luego de someter a las células a estímulos de diferenciación osteogénica al menos hasta los 5 días de diferenciación, tiempo máximo ensayado (figura 13A y 13C). Esto se observa tanto en células provenientes de donantes controles como osteoporóticas. Cuando se analizan los niveles de PPAR γ durante la diferenciación adipogénica, si se observan cambios importantes (Figura 13B y 13D). En condiciones basales, los niveles de expresión del PPAR γ son

bastante similares entre ambos tipos de muestras. En condiciones de diferenciación adipogénica, tanto las células provenientes de donantes controles como osteoporóticas aumentan el nivel de expresión de PPAR γ (1,9 y 2,4 veces, respectivamente) para posteriormente volver a valores similares a los basales (día 5). En ambos casos el valor máximo se obtiene a las 24 horas de diferenciación adipogénica. Sin embargo, la expresión del factor es un 60% mayor en muestras provenientes de donantes osteoporóticas y se mantiene por un tiempo mas prolongado durante el periodo de diferenciación estudiado.

Figura 13: Determinación de los factores de transcripción durante el transcurso de la diferenciación



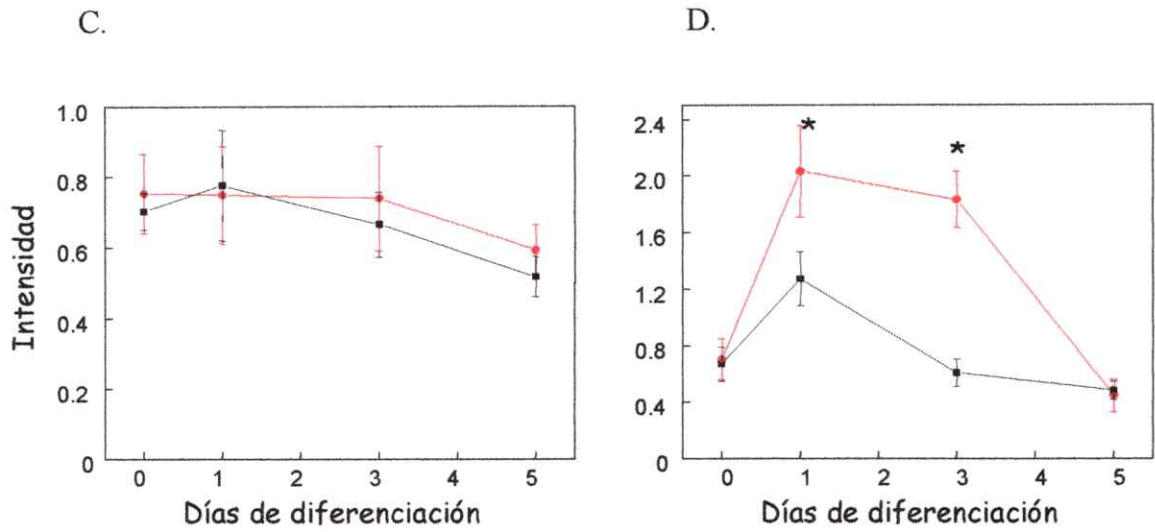


Figura 13. Westernblot para Cbfa1 (A) y PPAR γ (B), con sus respectivos controles de actina. Cuantificación de las bandas para Cbfa1 (C) y PPAR γ (D), normalizadas con actina. Las líneas de color rojo representan a las células provenientes de donantes osteoporóticas y las de color negro a las células provenientes de donantes controles. Los resultados, correspondientes a dos muestras por tipo de donante, se expresan como la razón entre la intensidad media de los factores v/s la de actina. Las diferencias observadas entre donantes es significativa (*) ($p < 0,05$).

DISCUSIÓN

Como consecuencia del aumento sostenido en la expectativa de vida de la población en los últimos años, la incidencia de osteoporosis postmenopáusicas ha adquirido cada vez más relevancia en mujeres tanto en Chile como en el resto del mundo. Esta patología, que depende de múltiples factores, se caracteriza por una disminución de la masa ósea, con lo cual se aumenta la susceptibilidad de sufrir fracturas, originando discapacidad y morbilidad en personas mayores, con el consiguiente gasto en salud. En los Estados Unidos más de 25 millones de personas sufren osteoporosis, convirtiendo a esta enfermedad en un grave problema de salud, con costos que superan los 17 billones de dólares anuales (National Osteoporosis Foundation, USA). En Chile, no se dispone de datos estadísticos detallados sobre la incidencia de la enfermedad y su costo para el Estado y el sector privado. Sin embargo, en el último tiempo ha aumentado la expectativa de vida de la población chilena y el número de mujeres de 60 años o más, el principal grupo de riesgo para esta enfermedad, alcanza el 6,4% de la población total según el Censo 2002. Hasta ahora son muchos los estudios, *in vivo* e *in vitro*, que se han realizado con el fin de dilucidar los orígenes y las causas de la osteoporosis y de esta manera, diseñar nuevas terapias que permitan tratar de mejor forma la enfermedad, con la consiguiente rebaja de los costos que dicha patología implica. A pesar de los múltiples esfuerzos desplegados, aún no se conocen con exactitud las causas de la enfermedad. Por otra parte, la mayoría de los estudios *in vitro* han sido desarrollados utilizando células óseas maduras, osteoclastos y/o

osteoblastos, siendo muy pocos los estudios que analizan como cambios en las características funcionales de las células progenitoras de osteoclastos (GM-CFU) y de osteoblastos (MSCs), pueden contribuir en la patogénesis de la enfermedad. Las MSCs son células que poseen la capacidad de autorrenovarse y que se pueden diferenciar a distintos fenotipos celulares (Caplan, 1991), siendo dos de las vías de diferenciación más importantes la osteogénica y la adipogénica. En el último tiempo se ha postulado la “teoría lipídica” para explicar el origen de la osteoporosis, en la cual se propone que en la médula ósea existe un reemplazo de células osteogénicas por tejido adiposo (Parhami y col, 1999). Resultados obtenidos *in vitro* apoyan los datos clínicos que muestran un aumento de tejido adiposo en la médula ósea de pacientes osteoporóticas, aunque hasta ahora no se conocen los mecanismos que dan cuenta de este hecho.

Sobre la base de los antecedentes presentados, en esta tesis se quiso estudiar si existían diferencias en la capacidad que tienen las MSCs obtenidas de muestras de médula ósea provenientes de donantes controles y osteoporóticas para diferenciarse hacia ambos linajes celulares, y determinar si estas diferencias podían ser explicadas por características intrínsecas de los progenitores presentes en la médula ósea o bien por la respuesta de estos frente a determinados factores. Para esto, se utilizaron muestras de médula ósea de ambos tipos de donantes, para la obtención y posterior estudio de las MSCs presentes en las muestras. Es importante recalcar que en la actualidad no existen estudios que utilicen este tipo de células obtenidas de donantes humanos que presenten la patología. Más aún, la mayoría de los estudios que utilizan progenitores humanos corresponden a líneas celulares inmortalizadas.

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran algunas similitudes y diferencias entre células provenientes de donantes controles y células provenientes de donantes osteoporóticas. Es así como las MSCs de donantes osteoporóticas tienen aumentado su potencial de diferenciación adipogénico con respecto a donantes controles, lo cual no puede ser explicado por el número de progenitores presentes en la médula ósea, ya que éste es similar en las muestras obtenidas de ambos tipos de donantes. Sin embargo, el análisis de los progenitores presentes en la médula ósea de ambos tipos de donantes muestra diferencias importantes a nivel del potencial de diferenciación de éstos, así como en su respuesta frente a estímulos externos como ocurre en el caso de la leptina. La respuesta a BMP-2 fue en ambos tipos de donantes similar, produciendo un aumento de la diferenciación osteogénica. Tampoco se observan diferencias significativas entre ambos tipos de donantes en la expresión del factor de transcripción Cbfa1, mientras que para PPAR γ , se observa un aumento en la expresión durante la adipogénesis siendo mayor en donantes osteoporóticas.

El aumento del potencial de diferenciación adipogénico observado en esta tesis en las MSCs provenientes de donantes osteoporóticas respecto de las donantes controles (3 veces mayor) están de acuerdo con datos obtenidos anteriormente en este laboratorio (Rodríguez y col, 2000), que reportan un aumento en la diferenciación adipogénica y una disminución de la diferenciación osteogénica en MSCs de donantes osteoporóticas. Estos resultados, obtenidos a nivel celular, también concuerdan con las observaciones clínicas e histomorfométricas existentes. Todos ellos apoyan la idea que durante la osteoporosis existe un aumento del tejido adiposo en la médula ósea asociado a una

disminución del número de células del linaje osteogénico (Nuttal y col, 1998; Nuttal y Gimble, 2000).

El aumento en la diferenciación hacia el linaje adipogénico no puede ser explicado por diferencias en el número de los progenitores presentes en la médula ósea, ya que en ambos tipos de donantes el número de progenitores es similar. Se puede entonces sugerir que en la osteoporosis las células progenitoras presentes en la médula ósea presentan un potencial de diferenciación osteogénico/adipogénico diferente, dependiendo del tipo de donante del cual deriven. Así, en la osteoporosis presentan un potencial osteogénico disminuido junto con un potencial de diferenciación adipogénico aumentado, lo cual puede ser uno de los factores relevantes que expliquen el aumento del número de adipocitos presentes en la médula ósea de este tipo de donantes y, por lo tanto, podría dar cuenta, en parte, del reemplazo de la población de células osteogénicas funcionales por tejido adiposo (Nuttal y col, 1998; Nuttal y Gimble, 2000). Sin embargo, estos cambios en los potenciales de diferenciación de los progenitores no pueden dar cuenta por si solos del aumento observado en el número de adipocitos de donantes osteoporóticas con respecto a las donantes controles. Es importante considerar también la respuesta que pudieran tener ambos tipos de células frente a factores que, se sabe, actúan a nivel óseo, como leptina y BMP. Más aún, tomando en cuenta que en ambos tipos de muestra, existe un porcentaje importante (alrededor de un 20%) de progenitores que exhiben tanto un potencial de diferenciación osteogénico como adipogénico (O/A). Por lo tanto, la respuesta que tengan estos progenitores bifuncionales frente a estímulos como los indicados, podrían explicar el aumento de la diferenciación hacia la línea adipogénica. En resumen, las diferencias observadas sugieren que en la osteoporosis

existe un mayor compromiso de los progenitores presentes en la médula ósea hacia la vía adipogénica y no un cambio significativo en el número total de éstos.

Diversas evidencias indican que leptina puede ser uno de los factores que podría jugar un rol importante en la regulación de la diferenciación de las MSCs. A este respecto, es importante mencionar que las mujeres postmenopáusicas con exceso de peso se encuentran más protegidas contra la osteoporosis que las personas delgadas y que en personas obesas los niveles plasmáticos de leptina se encuentran elevados (Odabasi y col, 2000; Goulding y Taylor, 1998; Karsenty, 2001). Sin embargo, aún no se encuentra una relación directa entre los niveles elevados de leptina y densidad mineral ósea. Por otra parte, se ha reportado que cultivos de adipocitos de médula ósea humana y osteoblastos primarios producen leptina (Reseland y col, 2001; Laharrague y col, 1998; Gordeladze y col, 2002), lo cual sugiere que esta hormona podría ser una señal paracrina importante entre adipocitos y células preosteoblásticas en el microambiente de la médula ósea, es decir podría tener un rol en el compromiso y/o diferenciación de los progenitores. También existen evidencias que muestran una acción directa de leptina a nivel celular (Thomas y col, 1999). Sería muy importante entonces determinar los niveles locales de producción de leptina, que pudieran dar cuenta de una acción paracrina en la médula ósea y los factores que pudieran estar regulando el nivel de su síntesis. Con estos antecedentes, se analizó el efecto de leptina sobre las MSCs obtenidas de donantes controles y osteoporóticas durante la diferenciación osteogénica y adipogénica.

El efecto de leptina observado por nosotros sobre las MSCs controles concuerda con los datos obtenidos por otros autores en líneas celulares estromales de médula ósea

humana (Thomas y col, 1999). En ambos casos se reporta una inhibición de la diferenciación adipogénica por efecto de la leptina junto con favorecer la diferenciación hacia el linaje osteogénico. Esto sugiere fuertemente que la acción protectora de leptina contra la osteoporosis observada en personas obesas se puede explicar por la acción directa de la hormona sobre las células progenitoras óseas (Thomas y Burguera, 2002). En condiciones normales leptina ejerce su efecto a través de su receptor de cadena larga, el cual es el único capaz de transducir la señal, activando la ruta de señalización JAK/STAT (Figura 14). Así, STAT3 activa la ruta de las MAP quinasas lo que conlleva a la activación de las ERKs (p-ERKs), las cuales son capaces de favorecer tanto la diferenciación osteogénica como de inhibir la diferenciación adipogénica (Jaiswal, 2000). Estos efectos están asociados con la activación del factor de transcripción Cbfa1 y la inhibición del factor de transcripción PPAR γ , ambos por fosforilación mediada por p-ERKs (Xiao, 2000; Adams, 1997). Por otra parte, en ratones se ha demostrado que el receptor de cadena corta para leptina es incapaz de activar la ruta de las STAT (Ghilardi, 1996). Es importante recalcar que en la actualidad no existen estudios sobre la acción de la leptina en MSCs provenientes de donantes osteoporóticas. Nuestros resultados muestran que, a diferencia de lo que ocurre con las células controles, leptina no inhibe la diferenciación de las MSCs de donantes osteoporóticas hacia el linaje adipogénico. Es decir, en este tipo de donantes leptina no sería capaz de revertir el proceso de diferenciación adipogénico. Este efecto diferencial podría ser explicado por diferencias en el mecanismo de acción, diferencias a nivel del receptor de membrana para leptina o por diferencias en el mecanismo de transducción de la señal. El ensayo de unión de ^{125}I -

leptina, el primero en analizar la proteína de unión leptina en MSCs, nos permitió determinar la alta afinidad de unión a leptina de las MSCs de ambos tipos de donantes, datos que están de acuerdo con aquellos reportados para receptores de leptina en otros tipos celulares (Barr y col, 1991; Liu y col, 1997). Aun cuando las MSCs provenientes de donantes osteoporóticas presentan diferencias en la capacidad de unión a leptina con respecto a las células controles bajo condiciones de diferenciación adipogénicas, esta diferencia no logra explicar del todo la ausencia de respuesta por parte de las MSCs de donantes osteoporóticas frente al estímulo con leptina en la adipogénesis. A su vez, es importante mencionar que el ensayo de unión no es capaz de distinguir entre el receptor de cadena corta y larga. Estas evidencias nos permiten sugerir entonces que en la osteoporosis podría existir una mayor expresión del receptor de cadena corta (OBR-C) en desmedro del receptor de cadena larga (OBR-L), lo cual resultaría en una deficiencia en activación de la ruta JAK/STAT (Figura 14). De acuerdo a lo indicado más arriba, esta deficiencia favorecería la adipogénesis y reduciría la osteogénesis. Aunque el rol exacto del receptor de leptina de cadena corta aun se encuentra en estudio, se cree que podría actuar como un reclutador de leptina y de esta manera ayudar a bajar las concentraciones de leptina libre en el suero (Ghilardi, 1996). Por lo tanto, sería interesante el determinar la proporción en que se encuentran los receptores de cadena larga y corta en ambos tipos de células, y ver de que manera estos receptores afectan la ruta de transducción de señales y la expresión de genes característicos de ambas vías de diferenciación.

FIGURA 14: Resumen de los resultados

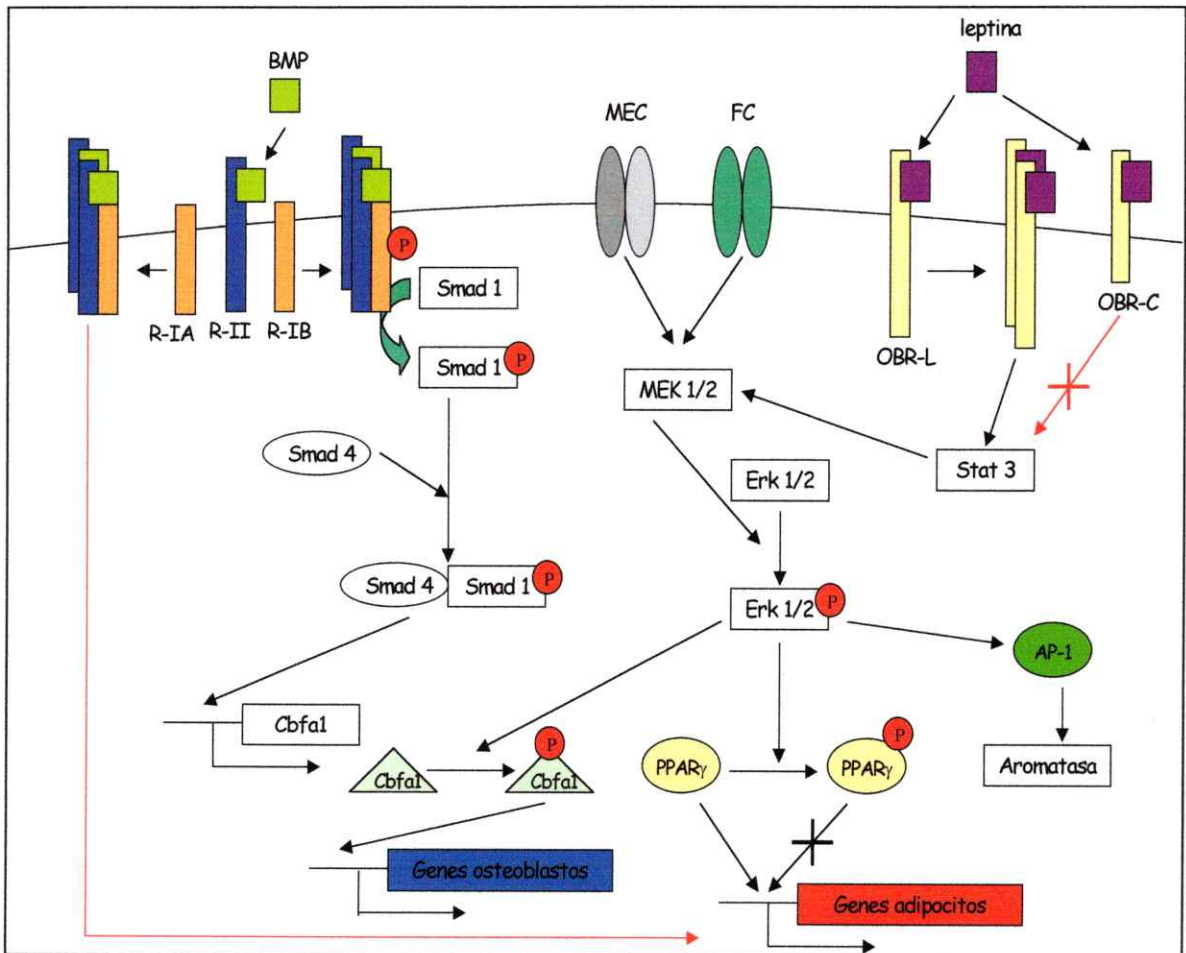


Figura 14. Cuadro resumen que muestra los principales resultados obtenidos en esta tesis y las principales rutas de señalización involucradas en los procesos de diferenciación osteogénica y adipogénica. Las flechas rojas indican el comportamiento esperado de células osteoporóticas frente a leptina y BMP.

También se puede postular que leptina puede ejercer su rol protector activando la síntesis *in situ* de estradiol, ya que se sabe que los estrógenos son agonistas osteogénicos y antagonistas de la adipogénesis (Dani, 1999) y por lo tanto juegan un papel fundamental en el proceso de remodelación ósea. Se sabe que leptina, en otros tipos

celulares, induce la expresión de la enzima aromatasa, enzima que transforma el andrógeno circulante en estrógeno o estradiol (Catalano, 2003), vía ERKs y AP-1 (Figura 14). Esto es muy importante ya que ésta es la fuente más significativa de estrógenos después de la menopausia. Por lo tanto, será muy interesante determinar el efecto de leptina sobre aromatasa en donantes osteoporóticas, para ver si diferencias a este nivel podrían dar cuenta del rol de leptina en este tipo de donantes.

En resumen, nosotros observamos un efecto directo de leptina sobre las MSCs y que este efecto es diferencial en MSCs provenientes de donantes controles y osteoporóticas. Así, en células controles leptina ejerció efectos osteogénicos y anti-adipogénicos, pero en células osteoporóticas el efecto anti-adipogénico es eliminado por completo.

Los datos sobre la acción de BMP-2 son concordantes con los datos reportados en la literatura que indican que las BMPs estimulan la actividad osteogénica de las MSCs, e inhiben el proceso adipogénico (Gimble y col, 1995). Es importante mencionar que el efecto estimulador de BMP-2 sobre la diferenciación osteogénica fue similar para ambos tipos de donantes. Por otra parte, es importante recordar que la transducción de señales producida por el estímulo con BMP requiere de la formación de un complejo entre los receptores de BMP tipo I y tipo II con su ligando, luego de lo cual este complejo heterodimeriza y es capaz de transducir la señal vía proteínas SMAD (Massagué, 1998). Esto finalmente lleva a la activación de la transcripción de Cbfa1, el cual en su forma fosforilada es capaz de incrementar la osteogénesis (Shui, 2003) (Figura 14). Recientemente se han caracterizado dos receptores tipo I para BMP: tipo IA y tipo IB, los cuales transmiten señales diferentes a la célula. El análisis de los

receptores de membrana para BMP, reveló que no existían diferencias importantes ni en la intensidad ni en la distribución del receptor de membrana tipo IA para BMP. Las diferencias observadas en la distribución de los receptores tipo IB de BMP en el proceso de diferenciación, sugieren que la activación de estos receptores juega un papel fundamental en la diferenciación de las células progenitoras a osteoblastos o adipocitos, tal como ha sido descrito por otros autores (Chen y col, 1998); los cuales muestran que la supresión de la función del receptor tipo IB de BMP tiene como consecuencia la pérdida de la capacidad de las células de diferenciarse hacia la vía osteogénica, describiendo por lo tanto a éstos como los receptores asociados a esta vía de diferenciación. Estos resultados permiten sugerir que el estímulo de diferenciación osteogénico produce cambios de distribución en los receptores tipo IB con respecto a las condiciones basales y que estos cambios son similares en ambos tipos de donantes. Esto concuerda con el aumento de la diferenciación osteogénica observada en ambos tipos de donantes frente al estímulo con BMP-2. Sin embargo, no se observan cambios significativos ni de intensidad ni de distribución de los receptores al ser sometidas las células de ambos donantes al estímulo con BMP-2, comparadas con células bajo condiciones de diferenciación osteogénica. Por lo tanto, BMP-2 ejercería su efecto estimulador sobre la osteogénesis a través de su receptor tipo IB en ambos tipos de donantes, lo cual concuerda de buena manera con los cambios observados en la distribución de este receptor bajo condiciones de diferenciación osteogénicas. Sin duda, resultaría muy importante el estudio del efecto de BMP-2 sobre la diferenciación adipogénica de ambos tipos de donantes y el rol que el receptor tipo IA cumple en este proceso. Aun cuando se sabe que la señal de BMP-2 por medio del receptor tipo IA es

capaz de inducir la expresión de PPAR γ (Chen y col, 1998), no se conoce con exactitud la ruta de señalización involucrada (Figura 14). Por otra parte, tampoco se sabe si existen diferencias en la expresión de este receptor bajo condiciones de diferenciación adipogénicas en donantes osteoporóticas, lo cual hace muy interesante su estudio. El conocer el efecto de BMP sobre de la diferenciación osteogénica puede resultar de vital importancia en el diseño de nuevas terapias contra la osteoporosis.

Se sabe que las BMPs, entre otras cosas, participan directamente en la diferenciación de células de hueso, estimulan la síntesis de colágeno tipo I y son componentes integrales de la matriz extracelular ósea (Chen y col, 1997), lo cual apoya la idea de que el microambiente de la médula ósea juega un papel clave en el proceso de remodelación ósea. Así por ejemplo, la unión de determinados factores de crecimiento (FC) a receptores específicos de membrana es capaz de inducir la diferenciación osteogénica, al igual que la interacción de ciertas integrinas con proteínas características de la matriz extracelular (MEC) tales como colágeno tipo I (Figura 14). Esta inducción de la osteogénesis mediada por estos factores se encuentra relacionada principalmente con la activación de la ruta de las MAP quinasas las cuales, tal como se dijo anteriormente, regulan la actividad de Cbfa1 y PPAR γ (Franceschi, 2003).

Tal como se mencionó en la introducción, los procesos de diferenciación osteogénicos y adipogénicos involucran la expresión de genes maestros asociados a cada fenotipo: Cbfa1 y PPARs, respectivamente. Cabe mencionar que la región del promotor de genes característicos de osteoblastos, tales como osteopontina, osteocalcina y sialoproteínas del hueso, contiene secuencias de unión a Cbfa1. Por otra parte la

supresión de Cbfa1 resulta en una completa pérdida en la capacidad de formación de hueso. Los resultados de expresión de Cbfa1 en células controles están de acuerdo con los datos de la literatura que muestran que en células de hueso de médula ósea humana existe una expresión constitutiva del factor que no se ve alterada bajo condiciones de diferenciación osteogénica. Sin embargo, si observa un aumento en la actividad de Cbfa1 bajo condiciones de diferenciación osteogénicas (Shui y col, 2003) a través de la determinación de la cantidad de proteína fosforilada. Como se vio anteriormente, esta activación sería mediada por las ERKs, las cuales son activadas por una gran variedad de factores presentes en el microambiente de la médula ósea. Por lo tanto, parece importante estudiar el rol que pudiese tener la activación de este factor ante determinados estímulos más que diferencias en la expresión en ambos tipos celulares.

En el caso de PPAR γ , los datos muestran que este factor se expresa más tardíamente durante el proceso de diferenciación adipogénico, lo cual sugiere que la función de este factor estaría relacionada con la diferenciación terminal a adipocitos, más que con el compromiso de las células progenitoras. Es importante hacer notar que algunos resultados obtenidos sugieren que PPAR γ 2 regula negativamente la plasticidad de las células de estroma suprimiendo la expresión de Cbfa1, lo que produce una disminución de la síntesis de moléculas producidas por osteoblastos (Lecka-Czernick y col, 1999). Los resultados observados y la relación existente entre los factores de transcripción PPAR γ y Cbfa1, pueden ser importantes para explicar las diferencias observadas en los potenciales de diferenciación de los progenitores presentes en la médula ósea, y por lo tanto de las diferencias observadas en el número de adipocitos. Se

puede decir entonces que durante la osteoporosis existe una mayor expresión de PPAR γ por parte de los progenitores, el cual junto con facilitar la diferenciación adipogénica de los mismos, podría estar inhibiendo la diferenciación hacia la vía osteogénica.

En resumen, los resultados obtenidos en esta tesis indican que durante la osteoporosis existe una diferenciación preferencial de las MSCs hacia el linaje adipogénico, lo cual puede ser explicado en parte por diferencias en la capacidad de diferenciación que tienen los progenitores presentes en la médula ósea, y no por diferencias en el número de progenitores. También las células progenitoras obtenidas de ambos tipos de donantes responden de manera diferencial frente a estímulos como es la presencia de leptina y BMP-2. También parece ser relevante en la diferenciación preferencial hacia adipocitos la expresión diferencial de los factores de transcripción Cbfa1 y PPAR γ involucrados en la diferenciación osteogénica y adipogénica, respectivamente.

Ya que no se conoce el mecanismo a través del cual leptina y BMP ejerce un efecto diferencial sobre las MSCs de ambos tipos de donantes, las alternativas de estudio para el futuro son variadas. Sin duda, resultaría muy interesante estudiar que ocurre con las rutas de señalización de estas células luego de ser sometidas a los distintos estímulos de diferenciación. Recordemos que, como se dijo anteriormente, tanto leptina como BMPs se unen a receptores específicos de membrana, dando inicio a una cadena de transducción de señales. Sería interesante también ver la manera en que responden las MSCs provenientes de ambos tipos de donantes frente a los factores estudiados, para ver si en conjunto pueden ser considerados como un tipo de terapia alternativo.

El conocer los mecanismos involucrados en la diferenciación osteogénica y adipogénica en ambos tipos celulares, permitiría el diseño de nuevas alternativas terapéuticas. Así, compuestos que produzcan inhibición de la adipogénesis conjuntamente con favorecer la diferenciación osteogénica, pueden ser de mucha utilidad en terapias contra la osteoporosis. Es importante mencionar que estas terapias que modulen la diferenciación celular a nivel de la médula ósea deben ser órgano-específico, ya que si ella compromete el tejido adiposo extramedular, su acción puede ser contraproducente.

CONCLUSIONES

1. Las MSCs provenientes de donantes osteoporóticas tienen una capacidad de diferenciación adipogénica significativamente mayor a la de donantes controles.
2. La mayor capacidad de diferenciación adipogénica de las MSCs provenientes de donantes osteoporóticas se debe, en parte, a diferencias en los potenciales de diferenciación de los progenitores presentes en la médula ósea y no a diferencias en el número de estos.
3. La adición de leptina o BMP-2 al medio de diferenciación produce efectos diferentes en ambos tipos de donantes. Aun cuando no se observan diferencias significativas entre ambas donantes, el aumento siempre es mayor en células provenientes de donantes controles.
4. Los factores estudiados pueden ser de mucha utilidad en terapias alternativas contra la osteoporosis, lo cual contribuiría a rebajar los altísimos costos que genera esta enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

Adams M, Reginato MJ, Shao D, Lazar MA y Chatterjee VK. 1997. Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site. *J Biol Chem* **272**: 5128-5132.

Barr VA, Lane K y Taylor SI. 1999. Subcellular localization and internalization of the four human leptin receptor isoforms. *J Biol Chem* **274**: 21416-21424.

Bastie C, Holst D, Gaillard D, Jehl-Pietri C y Grimaldi PA. 1999. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor PPARdelta promotes induction of PPARgamma and adipocyte differentiation in 3T3C2 fibroblasts. *J Biol Chem* **274**: 21920-21925.

Bennett JH, Joyner CJ, Triffitt JT y Owen ME. 1991. Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential. *J Cell Sci* **99**: 131-139.

Caplan AI. 1991. Mesenchymal stem cells. *J Orthoph Res* **9**: 641-650.

Catalano S, Marsico S, Giordanos C, Mauro L, Rizza P, Panno ML y Ando S. 2003. Leptin enhances, via AP-1, expresión of aromatase in the MCF-7 line. *J Biol Chem* **278**: 28668-28676.

Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, Lakey ND, Culpepper J, Moore KJ, Breitbar RE y Duyk GM. 1996. The evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* **84**: 491-495.

Chen D, Ji X, Harris MA, Feng JQ, Karsenty G, Celeste AJ, Rosen V, Mundy GR y Harris SE. 1998. Differential roles for bone morphogenetic protein (BMP) receptor type IB and IA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages. *J Cell Biol* **142**: 295-305.

Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nycce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL y Caro JF. 1996. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* **334**: 292-295.

Dani C. 1999. Embryonic stem cell-derived adipogenesis. *Cells Tissues Organs* **165**: 173-180.

Franceschi RT y Xiao G. 2003. Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, Runx2: Responsiveness to múltiple signal transduction pathways. *J Cell Biochem* **88**: 446-454.

Gajardo H. 1997. Métodos de evaluación de la masa ósea. *Rev Chil Rad* **3**: 39-45.

Garat S. 1999. Caracterización de células progenitoras mesenquimáticas (MSCs) en osteoporosis. Tesis (Magister en Ciencias de la Nutrición, mención Nutrición Humana). Universidad de Chile, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA).

Ghilardi N, Ziegler S, Wiestner A, Stoffel R, Heim MH y Skoda RC. 1996. Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 6231-6235.

Gimble JM, Morgan C, Kelly K, Wu X, Dandapani V, Wang CS y Rosen V. 1995. Bone morphogenetic proteins inhibit adipocyte differentiation by bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem* **58**: 393-402.

Gimble JM, Robinson CE, Wu X y Kelly KA. 1996. The function of adipocytes in the bone marrow stroma: An update. *Bone* **19**: 421-428.

Glasow A, Kiess W, Anderegg U, Berthold A, Bottner A y Kratzsch J. 2001. Expression of leptin (Ob) and leptin receptor (Ob-R) in human fibroblasts: regulation of leptin secretion by insulin. *J Clin Endocrinol Metab* **86**: 4472-4479.

Glauber HS, Vollmer WM, Nevitt MC, Ensrud KE y Orwoll ES. 1995. Body weight versus body fat distribution, adiposity, and frame size as predictors of bone density. *J Clin Endocrinol Metab* **80**: 1118-1123.

Gordeladze JO, Drevon CA, Syversen U y Reseland JE. 2002. Leptin stimulates human osteoblastic cell proliferation, de novo collagen síntesis, and mineralization: impact on differentiation markers, apoptosis, and osteoclastic signaling. *J Cell Biochem* **85**: 825-836.

Goulding A y Taylor RW. 1998. Plasma leptin values in relation to bone mass and density and to dynamic biochemical markers of bone resorption and formation in postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* **63**: 456-458.

Harada H, Tagashira S, Fujiwara M, Ogawa S, Katsumata T, Yamaguchi A y Nakatsuka M. 1999. Cbfa1 isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation. *J Biol Chem* **274**:6972-6978.

Holloway WR, Collier FMcL, Aitken CJ, Myers DE, Hodge JM, Malakellis M, Gough TJ, Collier GR y Nicholson GC. 2002. Leptin Inhibits Osteoclast Generation. *J Bone Miner Res* **17**: 200-209.

Instituto Nacional de Estadísticas, Censo 2002: "Población de 15 años o más, por Religión, según División Político Administrativa, Sexo y grupos de Edad" [en línea] www.ine.cl [consulta: 9 Junio 2004).

Jaiswal RK, Jaiswal N, Bruder SP, Mbalaviele G, Marshak DR y Pittenger MF. 2000. Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* **275**: 9645-9652.

Kadiyala S, Jaiswal N y Bruder SP. 1997. Culture-expanded, bone marrow-derived mesenchymal stem cells can regenerate a critical-sized segmental bone defect. *Tissue Eng* **3**: 173-185.

Karsenty G. 2001. Leptin control bone formation through a hypothalamic relay. *Recent Prog Horm Res* **56**: 401-415.

Khosla S, Atkinson EJ, Riggs BL y Melton LJ. 1996. Relationship between body composition and bone mass in women. *J Bone Miner Res* **11**: 857-863.

Kielar D, Clark JS, Ciechanowicz A, Kurzawski G, Sulikowski T y Naruszewicz M. 1998. Leptin receptor isoforms expressed in human adipose tissue. *Metabolism* **47**: 844-847.

Kim GS, Hong JS, Kim SW, Koh J-M, An CS, Choi J-Y 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.

Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamagushi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, 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 arrest of osteoblasts. *Cell* **89**: 755-764.

Laharrague P, Larrouy D, Fontanilles AM, Truel N, Campfield A, Tenenbaum R, Galitzky J, Corberand JX, Penicaud L y Casteilla L. 1998. High expression of leptin by human bone marrow adipocytes. *FASEB J* **12**: 747-752.

Lecanda F, Avioli LV y Cheng S-L. 1997. Regulation of bone matrix protein expression and induction of differentiation of human osteoblasts and human bone marrow stromal cells by bone morphogenetic protein-2. *J Cell Biochem* **67**: 386-398.

Lecka-Czernick B, Gubrij I, Moerman EJ, Kajkenova O, Lipschitz DA, Manolagas SC y Jilka RL. 1999. Inhibition of *Osf2/Cbfa1* expression and terminal osteoblast differentiation by PPAR γ 2. *J Cell Biochem* **74**: 357-361.

Lee G-H, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI y Friedman JM. 1996. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* **379**: 632-635.

- Liu C, Liu X-J, Barry G, Ling N, Maki RA y De Souza EB. 1997. Expression and characterization of a putative high affinity human soluble leptin receptor. *Endocrinology* **138**: 3548-3554.
- Long MW, Robinson JA, Ashcraft EA y Mann KG. 1995. Regulation of human bone marrow-derived osteoprogenitor cells by osteogenic growth factors. *J Clin Invest* **95**: 881-887.
- Mandrup S y Lane MD. 1997. Regulating Adipogenesis. *J Biol Chem* **272**: 5367-5370.
- Manolagas S. 2000. Birth and death of bone cells: Basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* **21**: 115-137.
- Massague J. 1998. TGF- β signal transduction. *Annu Rev Biochem* **67**: 753-791.
- Minguell JJ, Conget P y Erices A. 2000. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. *Braz J Med Biol Res* **33**: 881-887.
- Nanbu-Wakao R, Fujitani Y, Masuho Y, Muramatu M y Wakao H. 2000. Prolactin enhances CCAAT enhancer-binding protein-beta (C/EBP beta) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) messenger RNA expression and stimulates adipogenic conversion of NIH-3T3 cells. *Mol Endocrinol* **14**: 307-316.
- National Osteoporosis Foundation, USA [en línea] www.nor.org [consulta: 9 Junio 2004).
- Nuttall ME, Patton AJ, Olivera DL, Nadeau DP y Gowen N. 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 ME y Gimble JM. 2000. Is there a therapeutic opportunity to either prevent or treat osteopenic disorders by inhibiting marrow adipogenesis?. *Bone* **27**: 177-184.
- Odabasi E, Ozata M, Turan M, Bingol N, Yonem A, Cakir B, Kutlu M y Ozdemir IC. 2000. Plasma leptin concentrations in postmenopausal women with osteoporosis. *Eur J Endocrinol* **142**: 170-173.
- Parhami F, Jackson SM, Tintut Y, Le V, Balucan JP, Territo M y Demer LL. 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.

Reseland JE, Syversen U, Bakke I, Qvigstad G, Eide LG, Hjertner O, Gordeladze JO y Drevon CA. 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 JP, Garat S, Gajardo H, Pino AM y 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 y 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.

Saladin R, Fajas L, Dana S, Halvorsen YD, Auwerx J y Briggs M. 1999. Differential regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 (PPAR gamma1) and PPAR gamma2 messenger RNA expression in the early stages of adipogenesis. *Cell Growth Differ* **10**: 43-48.

Shapiro IM. 1999. Discovery: *Osf2/Cbfa1*, a master gene of bone formation. *Clin Orthop Res* **2**: 42-46.

Shui C, Spelsberg TC, Riggs BL 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.

Siegrist-Kaiser CA, Pauli V, Juge-Aubry CE, Boss O, Permin A, Chin WW, Cusis I, Rohner-Jeanrenaud F, Burger AG, Zapf J y Meier CA. 1997. Direct effects of leptin on brown and white adipose tissue. *J Clin Invest* **100**: 2858-2864.

Takahashi Y, Okimura Y, Mizuno I, Iida K, Takahashi T, Kaji H, Abe H y Chihara K. 1997. Leptin induces 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 y Burguera B. 2002. Is leptin the link between fat and bone mass? *J Bone Miner Res* **17**: 1563-1569.

Thomas T, Burguera B, Melton LJ III, Atkinson EJ, Riggs BL y Khosla S. 2000. Relationship of serum leptin levels with body composition, sex steroid, and insulin levels in men and women. *Metabolism* **49**: 1278-1284.

Thomas T, Gori F, Khosla S, Jensen MD, Burguera B y 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.

Wright NM, Cheng SL, Riew KD, Avioli LV y Lou J. 1998. In vitro and in vivo induction of bone formation using a recombinant adenoviral vector carrying the human BMP-2 gene. *Bone* **23**: 393-402.

Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, McKeon C, Darlington GJ y Spiegelman BM. 1999. Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell* **3**: 151-158.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L y Friedman JM. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**: 425-432.

Xiao G, Jiang D, Thomas P, Douglas M, Guan K, Karsenty G y Franceschi RT. 2000. MAPK pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor, Cbfa1. *J Biol Chem* **275**: 4453-4459.

ANEXOS



CASILLA 138 - 11
SANTIAGO - CHILE
FAX : (56) 2 - 221 - 4030
www.inta.cl
TELEFONOS: 878 1400 - 878 1405
878 1487 - 878 1416
878 1401 - 878 1497

UNIVERSIDAD DE CHILE
INSTITUTO DE NUTRICION
Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS



UNIVERSIDAD DE LAS NACIONES
UNIDAS
UNIDAD DE INVESTIGACION
Y DOCENCIA

COMITÉ DE ETICA

Acta de Aprobación N°17 20 de Junio 2001

Asisten: M. Olivares, C. Muñoz, AM. Pino, P. Peirano, D. Bunout, R.,J. Espinoza.

Preside: Dr. Manuel Olivares

Proyecto: "Cambios en señales específicas privilegian la diferenciación hacia adipositos de las células progenitoras mesenquematias (MSs) en la médula ósea de mujeres osteoporóticas".

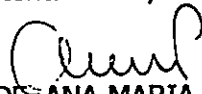
Investigador: Dr. Juan Pablo Rodríguez

Se analiza el Proyecto a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, del Código de Nüremberg y del Reglamento de Etica del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA) de la Universidad de Chile.

Sobre las bases de la información proporcionada en el texto (Copia en archivo) y de los antecedentes aportados personalmente por los investigadores, el Comité de Etica, estima que el estudio no significa para los sujetos involucrados, riesgos físicos, psíquicos, social, legal o de otra naturaleza, propios de este tipo de investigación.

En virtud de tales consideraciones el Comité otorga la autorización correspondiente para la realización del estudio dentro de las especificaciones señaladas en el protocolo.

Atentamente,


PROF. ANA MARIA PINO


DR. PATRICIO PEIRANO


DR. MANUEL OLIVARES
Presidente


PROF. CARLOS MUÑOZ


DR. DANIEL BUNOUT


DR. JULIO ESPINOZA
Secretario

Santiago, 18 de Junio 2001

Dr.
Germán Seitz
Traumatología

ACTA DE APROBACION DE PROYECTO

Sobre la base de la información proporcionada por los autores en el texto del proyecto "**Cambios en señales específicas privilegian la diferenciación hacia adipositos de las células progenitoras mesenquimáticas MSCs**), en la médula posea de mujeres osteoporóticas", del que es investigador principal el Dr. Juan Pablo Rodríguez "no hay objeciones, ni en su diseño ni desde el punto de vista ético, para que usted colabore con este propósito, en la obtención de muestras de medula ósea.

En virtud de estas consideraciones, se le otorga la autorización correspondiente para la realización del estudio antes señalado.

Le solicitamos usar para el consentimiento informado fotocopias del formulario validado por este Comité, conservar toda la documentación en su poder por lo menos hasta tres años cerrado el estudio e informarnos a lo menos una vez al año de su marcha, como también de cualquier publicación o presentación a congresos que de el se generen.

Agradeciendo su colaboración le saluda atentamente

Dr Patricio Michaud Ch.
Coordinador
Comité de Bioética e Investigación
Servicio de Salud
Metropolitano Sur Oriente

COMITE DE BIOETICA E INVESTIGACION
SERVICIO DE SALUD
METROPOLITANA SUR ORIENTE

Autorización Informada

Yo,.....,
C.I....., autorizo la utilización de parte del tejido óseo obtenido durante el procedimiento quirúrgico, al que necesariamente seré sometida como parte del tratamiento, en un protocolo de investigación de osteoporosis.

Todo lo anterior en el entendido que la obtención de este tejido no implica un riesgo adicional al procedimiento quirúrgico indicado por mi médico tratante Dr , ni que tampoco se extraiga una cantidad de tejido mayor que la estrictamente necesaria para realizar el procedimiento quirúrgico.

Como parte de este protocolo se me realizará una densitometría ósea, el cual es un procedimiento no invasivo. En esa oportunidad, también se me tomará una muestra de sangre (20 ml), para la realización de un hemograma, un perfil bioquímico, y para determinar los niveles de PTH, FSH y cortisol, para descartar enfermedades que afectan el metabolismo óseo. Los costos de estos exámenes como del traslado del paciente desde y hacia el INTA serán de cargo del proyecto.

He sido informada que el hecho que me rehuse a participar de este protocolo de investigación no menoscabará la atención médica a la cual debo ser sometida.

.....

Firma

Santiago,de.....del 200...