

UCH-FC
Biotecnología
F634e
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

**EFFECTO DE LEPTINA Y ESTRÓGENO SOBRE EL SISTEMA
RANK/RANKL/OPG IMPLICADO EN EL PROCESO DE REMODELACIÓN
ÓSEA**

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

Andrea Eugenia Flores Ramírez

Enero, 2009

Santiago-Chile

Director de tesis: Dr. Juan Pablo Rodríguez

Laboratorio de Biología Celular, INTA

Profesor patrocinante: Dr. Tulio Nuñez



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

“EFECTO DE LEPTINA Y ESTROGENO SOBRE EL SISTEMA RANK/RANKL/OPG IMPLICADO EN EL PROCESO DE REMODELACIÓN OSEA”

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

ANDREA EUGENIA FLORES RAMIREZ

Dr. Juan Pablo Rodríguez Vives
Director Seminario de Título

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Rodriguez', written over a horizontal line.

Comisión de Evaluación

Dra. Verónica Palma Alvarado
Presidente Comisión

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Palma', written over a horizontal line.

Dr. José Luis Arias Bautista
Evaluador

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Arias', written over a horizontal line.



Santiago de Chile, _____ 2009.



Nací en Invierno, el 18 de Julio de 1979. Soy la menor de 3 hermanos; para cuando mis padres decidieron tenerme ellos ya tenían sus años, y mis hermanos los suyos.

Recuerdo que desde pequeña tendí a entretenerme en el gran patio de mi casa. Lleno de plantas, árboles y un mundo natural que explorar. Me llamaba la atención bichos, plantas, palitos de madera, la tierra, el agua, y todo lo que parecía vivo. Cuando me di cuenta de cómo estaban estructurados estos organismos, y que su funcionamiento implica la unión de una enorme variedad de factores interrelacionados me emocione y me sentí más atraída por este mundo.

Dentro de mis aficiones se encuentra la lectura, sobretodo lo relacionado con fantasía épica y ciencia ficción, así como las películas de ese tipo. Supongo en este ámbito se junta la complejidad de la vida y el espacio para soñar hacen falta en este mundo.

Estudie en el Liceo 7 de Providencia, donde la orientación daba prioridad a ramos como Historia, Castellano, Matemáticas y Biología. Siempre estaba presente el desafío y maravilla del mundo molecular, sólo que entonces no lo tenía tan claro. Sólo sabía que tenía que estudiar.

Finalmente entré a la Universidad de Chile y estudie Bachillerato. En ese nivel pude nivelar lo que sabía, y comprender Química, Física, Filosofía, entre otros. Todos esos elementos se fueron mezclando para que finalmente optara por estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular.

Los años que duró la carrera no fueron realmente los mejores de vida. Fue muy difícil soportar las enfermedades y muerte de mis papas mientras lidiaba con la carga académica y emocional de la Universidad. A eso se sumo darme cuenta que el ambiente científico no era lo que yo esperaba, tal vez demasiado frío, competitivo, impersonal. Y si bien una actitud científica requiere objetividad, me parece que no debe transformarse en relaciones interpersonales frías. Me cuestioné. Sin embargo, terminé mi carrera, y aprendí. Gané amigos, y conocí a mi pareja.

Hoy, finalizando mi proceso de formación, me redefino para el futuro. ¿Qué quiero hacer?. Espero encontrar trabajo en esto, porque me gusta, porque me sigue fascinando el mundo molecular. Aportar en perder el miedo en hacer investigación y llevar los resultados al mercado. Hacer del conocimiento teórico aplicación práctica, y que sirva socialmente.

Creo que si se pudiera contar con los recursos monetarios y el apoyo de las instituciones esta carrera podría ser una ventana para el progreso de este país. Lamentablemente aún se aprecia temor. La formación de los profesionales no esta para nivel industrial o para la generación y desarrollo de proyectos propios. Me parece que hay que mostrarse, invertir y con ello cooperar para dejar atrás el estancamiento del progreso nacional.



AGRADECIMIENTOS

A mis padres por el apoyo, cariño y fuerza que me entregaron mientras vivieron, a mis hermanos, por su apoyo en los momentos difíciles. A mi director de tesis el Dr. Juan Pablo Rodríguez por su tiempo y ayuda en el desarrollo de esta tesis. A mis compañeros y amigos Alejandro Lobos, María José Acuña, Daniela Acuña, Andrea Leiva, Nicole Farfán, Sylvia Flores, por acompañarme y apoyarme en buenos y malos momentos y por darme ánimos todo el tiempo.

Agradezco a mi gran amigo Sebastián Rubio quien me entregó, con una buena disposición increíble, muchas y largas horas de apoyo, discusiones y risas que me sirvieron enormemente para escribir esta tesis.

No puedo dejar de agradecer a todas aquellas personas a los cuales es imposible nombrar en tan poco espacio y que también me acompañaron durante estos años pero que por diversos motivos ya no se encuentran cerca, lo que no impide que los recuerde con mucho cariño.

Pero por sobre todo agradezco a Alberto, por su amor sin condiciones en todos estos años, su apoyo y compañía constantes, y por no dejarme bajar los brazos en ningún momento y por darme la alegría de vivir y las ganas de seguir adelante.





ÍNDICE DE MATERIAS

I INTRODUCCIÓN	1
1 Tejido Óseo: características generales	1
2 Remodelación ósea	3
3 Regulación hormonal del remodelamiento óseo	5
3.1 Estrógenos	6
3.2 Leptina	8
4 Sistema RANK/RANKL/OPG	11
4.1 Receptor activador del factor nuclear	11
4.2 Ligando de unión al Receptor Activador de NF-kB	12
4.3 Osteoprotegerina (OPG)	13
4.4 Interacción RANK/RANKL/OPG	15
II HIPÓTESIS DE TRABAJO	18
III OBJETIVO GENERAL Y ESPECIFICOS	18
1 Objetivo general	18
2 Objetivos específicos	18
IV MATERIALES Y MÉTODOS	19
1 Donantes	19
2 Obtención y purificación de MSC	19
3 Expansión in Vitro MSC	20
4 Diferenciación Osteogénica de MSC	21
5 Análisis de fosfatasa alcalina por citoquímica	22

6 Lisis Celular	22
7 Análisis de Western Blot para RANKL y OPG	23
8 Extracción de RNA y RT-PCR	24
9 Análisis estadístico	26
V RESULTADOS	27
1 Establecimiento de cultivos de MSCs de donantes osteoporóticas	27
2 Diferenciación osteogénica de MSCs	27
3 Análisis de la expresión de las proteínas RANKL y OPG en cultivos de MSC en diferenciación osteogénica	29
3.1 Expresión de proteína RANKL	29
3.2 Expresión de proteína OPG	33
3.3 Relación RANKL/OPG	36
4 Análisis de la expresión de los transcritos RANKL y OPG en cultivos de MSC mediante RT-PCR.	39
4.1 Expresión del transcrito de RANKL	40
4.2 Expresión del transcrito de OPG	43
VI DISCUSIÓN	49
VII CONCLUSIONES	58
VIII BIBLIOGRAFÍA	59
IX ANEXO	65



ÍNDICE DE TABLAS

1 Tabla de partidores utilizados para amplificación por RT-PCR

25





ÍNDICE DE FIGURAS

1 Formación de Osteoclastos y Osteoblastos a partir de células progenitoras	2
2 Proceso de remodelación ósea	4
3 Mecanismo de acción de OPG y RANKL	17
4 hMSC en cultivo	28
5 Expresión de Colágeno tipo 1 y Osteocalcina	28
6A Análisis de Western Blot para RANKL con estímulo de leptina	31
6A.2 Gel representativo de Western Blot para RANKL	31
6B Análisis de Western Blot para RANKL con estímulo de leptina, Androstenediona y leptina androstenediona	32
7A Análisis de Western Blot para OPG con estímulo de leptina	34
7A.2 Gel representativo de Western blot para OPG	34
7B Análisis de Western Blot para OPG con estímulo de leptina, Androstenediona y leptina androstenediona	36
8A Análisis de relación RANKL/OPG con estímulo de leptina	38
8B Análisis de relación RANKL/OPG con estímulo de leptina, Androstenediona y leptina androstenediona	39
9A Análisis de PCR para RANKL con estímulo de leptina	41
9A.2 Gel representativo de PCR para RANKL	41
9B Análisis de PCR para RANKL con estímulo de leptina, Androstenediona y leptina androstenediona	42
10A Análisis de PCR para OPG con estímulo de leptina	44
10A.2 Gel representativo de PCR para OPG	44
10B Análisis de PCR para OPG con estímulo de leptina, Androstenediona y leptina androstenediona	45

11A Análisis de relación RANKL/OPG con estímulo de leptina	47
11B Análisis de relación RANKL/OPG con estímulo de leptina, Androstenediona y leptina androstenediona	48



LISTA DE ABREVIATURAS

ALP Fosfatasa Alcalina

ADN Ácido Desoxirribonucleico

ADNc Ácido Desoxirribonucleico complementario

ARN Ácido Ribonucleico

ARNm Ácido Ribonucleico mensajero

DMO Densidad mineral ósea

CO₂ Dióxido de carbono

COL1 Colágeno tipo 1

DMEM Medio Tagle modificado por Dulbecco

DMEM-10%SF Medio DMEM suplementado con 10% suero fetal bovino

dNTP 2'-deoxinucleósido 5'-trifosfato

EDTA Ácido etilen-diamino-tetra-acético

EGF Factor de crecimiento epidermal

ERK Extracellular Related Kinase

GDPH Glucosa Fosfato Deshidrogenada

HCl Ácido Clorhídrico

hMSC Células troncales (estromal) mesenquimáticas humanas

IL Interleukina

INF g Interferón Gamma

M-CSF Factor estimulante de colonias de macrófagos

MO Medio Osteogénico

MOPS Ácido 3-N Morfolino-Propanosulfónico
OCIF factor de inhibición de la osteoclastogénesis
OPG Osteoprotegerina
PAGE Electroforesis en geles de Archilamida
PBS Tampón Fosfato Salino
RANK Receptor activador del factor nuclear (NF- κ B)
RANKL Ligando de unión al Receptor Activador de NF- κ B
rpm Revoluciones por minuto
RT-PCR Reverse Transcripte Polymerase Chain Reaction
SDS Dodecil sulfato de Sodio
SPSS Statistical Package for the Social Sciences
TBS Tampón Tris Salino
TNF- α Factor de necrosis tumoral alfa
TNFR Receptor del Factor de necrosis tumoral

RESUMEN

La gran incidencia de patologías óseas sobretodo en la población de tercera edad ha llevado, en el último tiempo, al desarrollo de diversos estudios con el fin de comprender el origen y las causas de estas enfermedades. Gracias a estos estudios es conocido que muchas de estas patologías son producto de un desbalance entre los procesos de reabsorción y formación de hueso, proceso que recibe el nombre de remodelación ósea.

La remodelación ósea es un proceso complejo que requiere de una regulación local realizado por citoquinas y factores de crecimiento y una regulación sistémica en que participan hormonas, citoquinas y factores de crecimiento.

Además de la regulación producida por citoquinas y hormonas, en los últimos años se ha descrito que la integración de las vías de regulación de la remodelación ósea es realizada por un conjunto de representantes de la familia TNF (*tumor necrosis factors*) conocido como sistema RANK/RANKL/OPG (receptor activador del factor nuclear (NF- κ B)/ ligando de unión al Receptor Activador de NF- κ B/ Osteoprotegerina), y se postula que este sistema se encuentra íntimamente relacionado con la interacción existente entre las células progenitoras osteoblásticas y el proceso de diferenciación-activación de los osteoclastos (Kostenuik, 2005).

En esta tesis nos interesó estudiar el rol que tienen dos hormonas con un reconocido efecto sobre el tejido óseo, como son leptina y estrógenos, sobre el sistema RANK/RANKL/OPG.

Los estudios propuestos en esta tesis se realizaron utilizando hMSC en cultivo, las cuales se aislaron a partir de muestras de médula ósea de donantes mujeres posmenopáusicas.

Los resultados de esta tesis sugieren que el efecto de las hormonas leptina y estrógeno sobre el metabolismo óseo ocurre a través de la alteración de la relación entre las proteínas OPG y RANKL. De esta forma, el rol protector de la leptina sobre la pérdida de masa ósea ocurriría disminuyendo los niveles de las proteínas RANKL y OPG fomentando la diferenciación osteoblástica (aumentando la síntesis de estradiol), inhibiendo la diferenciación adipogénica e inhibiendo la resorción ósea.

Por su parte los estrógenos ejercen su efecto favoreciendo la diferenciación osteoblástica al incrementar los niveles de OPG y disminuyendo por ende la respuesta de los precursores osteoclasticos a la presencia de RANKL.

Estos resultados pueden resultar útiles en futuras terapias contra la osteoporosis y otras enfermedades óseas, lo que podría contribuir a una baja de los costos de tratamiento para estas enfermedades y en una mejor calidad de vida para los pacientes.

ABSTRACT

The impact of bone disease especially in the elderly has lead, in the latest years, to the development of different studies to understand the origins and causes of these diseases. From to these studies, it is well known that many of the pathologies are product of an imbalance between the reabsortion processes and bone formation, process that receives the name of "bone remodeling".

Bone remodeling is a complex process regulated locally by cytokines and growth factors, among others, and systemically in which hormones, cytokines and growing factors are involved.

Besides the regulation produced by cytokines and hormones, in the last years it has been reported that the regulation bone remodeling is made possible by a set of representatives of the TNF (tumor necrosis factors) family known as RANK/RANKL/OPG (nuclear factor receiver activator (NF-kB)/ tying the NF-kb receptor activator /osteoprotegerin), and it has been proposed that this system is closely related with the existing interaction between osteoblast progenitors and the osteoclast differentiation-activation process (Kostenuik, 2005).

In this thesis, we were interested to study the role that two hormones, with a well-known effect on the bone tissue, have on the system RANK/RANKL/OPG: leptin and estrogen.

Studies proposed in this thesis have been made using hMSC cultures, which were isolated from bone marrow samples of postmenopausal women donors.

The results of this thesis suggest that the effect of the leptin and estrogen hormones on the bone metabolic process occurs through the alteration of the relation between the OPG and RANKL proteins. In this way, the protective role of the leptin over the loss of bone matter happens diminishing the levels of RANKL and OPG proteins, encouraging osteoblastic differentiation (increasing the estradiol synthesis), inhibiting the adipogenic differentiation, and inhibiting the bone resorption. On the other hand, estrogens stimulate the osteoblastic differentiation increasing the OPG levels and therefore lowering the response of the osteoclastic precursors in presence of RANKL.

These results can be useful in future therapies against osteoporosis and other bone diseases, which could contribute to a drop in treatment costs for these diseases and a higher quality of life for the patients.

INTRODUCCIÓN

1. Tejido Óseo: características generales

El sistema esquelético, o esqueleto, está compuesto principalmente por hueso y cartilago, y es responsable de cumplir con 3 funciones principales: soportar y anclar la musculatura para la locomoción, ser una reserva de iones para el organismo (Ejemplos: calcio y fósforo) y proteger la médula ósea y los órganos vitales.

El hueso es un órgano que está formado por células, una matriz extracelular mineralizada que cuenta además con fibras de colágeno y proteínas no colágenas, que en conjunto le otorgan su resistencia y flexibilidad características.

Los tipos de células que son parte del tejido óseo corresponden a **Células osteoprogenitoras** que provienen de las células mesenquimáticas (MSCs), por lo que tienen un gran potencial de proliferación y dan origen a células que se diferencian a osteoblastos u condroblastos. Luego se encuentran los **Osteoblastos** que corresponden a células diferenciadas a partir de las células MSCs ya mencionadas y de los cuales depende la síntesis de la matriz ósea, por consiguiente son responsables del desarrollo, crecimiento, mantención y reparación del hueso, además cumplen un rol importante en la diferenciación y activación de los osteoclastos (Ducy y col, 2000). Otro tipo celular importante son los **Osteocitos** que son células que se forman a partir de la diferenciación de los osteoblastos, rodeadas por matriz ósea que se ubican al interior del tejido óseo, en sitios llamados lagunas óseas; son capaces de sintetizar y

reabsorber componentes de la matriz ósea pero en forma limitada y son los responsables de sensor las tensiones físicas del hueso y regular el remodelamiento óseo (Teitelbaum, 2000). Por último se encuentran los **Osteoclastos** los cuales corresponden a células móviles multinucleadas, formadas por la fusión de monocitos pertenecientes al linaje de los fagocitos mononucleares. Su función es destruir el hueso dañado o viejo. (Suda y col, 1992) (Figura 1).

Formación de Osteoclastos y Osteoblastos a partir de células progenitoras

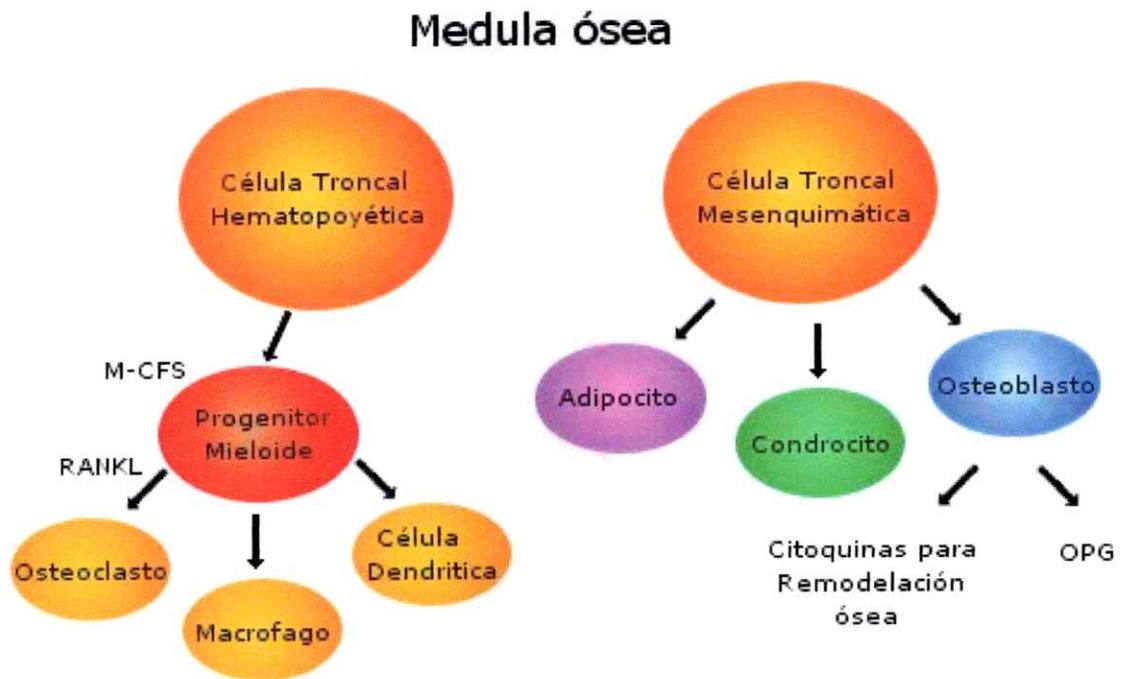


Figura 1. Esquema que muestra el origen de osteoclastos, células dendríticas y macrófagos a partir de células troncales hematopoyéticas y el origen de osteoblastos adipocitos y condrocitos a partir de células troncales mesenquimáticas. Modificado de McCormick R. K.. Osteoporosis: Integrating biomarkers and other diagnostic correlates into the management of bone fragility. *Altern Med Rev* 2007; 12 (2): 113-145.

Estas células trabajan en conjunto realizando constantes cambios en el tejido óseo para su crecimiento y mantención. Este proceso se denomina remodelación ósea.

2. Remodelación ósea

El proceso de remodelación ósea consta de dos fases fundamentales: la primera es la etapa llevada a cabo por los osteoclastos, los que destruyen el hueso dañado o "hueso viejo" mediante la liberación de enzimas lisosomales hacia el exterior y produciendo una acidificación del microambiente que baña al tejido óseo a reabsorber, acción denominada reabsorción, y que tiene una duración aproximada de 3 semanas por sitio (Suda y col, 1992) muriendo finalmente por apoptosis; la segunda etapa es la formación, que consiste en la síntesis y depósito de matriz extracelular ósea o "hueso nuevo" por los osteoblastos y cuya duración es aproximadamente de 3 a 4 meses (Ducy P y col, 2000). Los osteoblastos involucrados en la remodelación ósea son incorporados a la matriz ósea convirtiéndose en osteocitos, se transforman en células de revestimiento o mueren por apoptosis (Manolagas y col, 2000). En condiciones normales ambos procesos se encuentran en equilibrio en zonas denominadas unidades multicelulares básicas (BMUs) o unidades remodeladoras de hueso, de modo que la masa ósea se mantiene constante. El hueso recién formado es el paso final de la remodelación y recibe el nombre de unidad estructural ósea (Figura 2).

Proceso de remodelación ósea

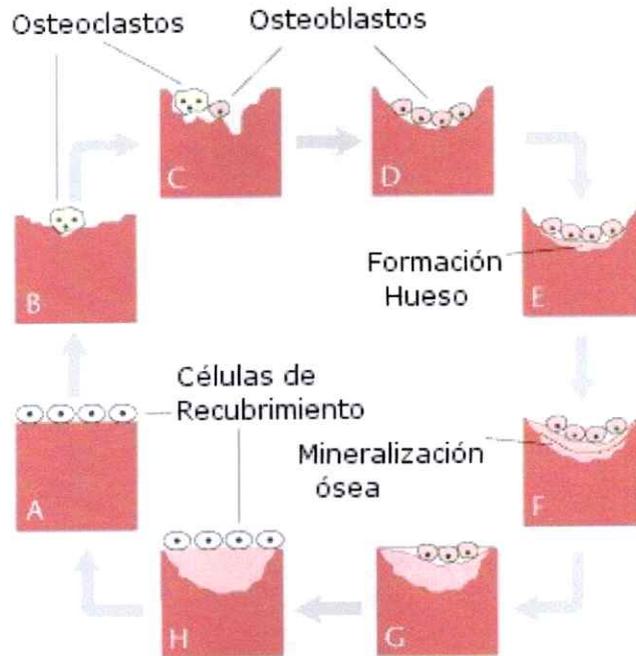


Figura 2 Esquema del proceso de remodelación ósea. A. Osteoblastos de recubrimiento (células de recubrimiento) frente a un daño estructural en el hueso liberan la superficie ósea para permitir la acción de los osteoclastos, B. Los osteoclastos realizan la reabsorción del hueso "viejo" o dañado, C, D, E. Síntesis y depósito de matriz extracelular ósea o "hueso nuevo" por los osteoblastos en la cavidad donde ocurrió la reabsorción, F, G. el nuevo hueso formado se mineraliza dando la rigidez característica al tejido, H el tejido formado es cubierto por osteoclastos de recubrimiento.

La remodelación ósea se inicia cuando los osteocitos detectan pequeños daños estructurales en el hueso (Troen y col, 2003), liberando una cascada de señales químicas las cuales dan a los osteoblastos de revestimiento (también conocidos como *lining cells*) la orden de retraerse liberando la superficie ósea y atrayendo a los precursores osteoclasticos (Teitelbaum y col, 2000). También la remodelación ósea se puede iniciar cuando los osteoblastos ubicados sobre la superficie del hueso son

activados por estímulos hormonales u otros factores. (Fuller K y col, 1998).

La cantidad de masa ósea requiere ser mantenida a lo largo del tiempo, y es por esto que la cantidad de hueso generado por los osteoblastos debe ser igual a la destruida por los osteoclastos. De no ser así se produce un balance óseo negativo o "alto recambio", motivo por el cual la masa ósea disminuye. Normalmente la masa ósea es mantenida hasta los 35-40 años, luego de esta edad se inicia un balance óseo negativo natural, el cual es responsable de la pérdida de masa ósea producida por el envejecimiento.

Cuando se produce un balance óseo negativo, debido a la edad o falta de estímulos mecánicos, se observa un aumento del número de unidades de remodelación activas y que presentan una mayor tasa de destrucción ósea que de formación de hueso, lo que deriva en una considerable pérdida de masa ósea (Raisz y col, 1999).

3. Regulación hormonal del remodelamiento óseo

La remodelación ósea es un proceso complejo que puede ser regulado a nivel local y/o nivel general.

En la regulación local las citoquinas son de gran importancia. Un representante de este grupo de moléculas es la Interleuquina 1β (IL- 1β) que estimula la reabsorción ósea e induce la proliferación osteoclastica, uniéndose con la Interleuquina 6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y el factor de crecimiento epidermal (EGF) en sus acciones. El TNF- α estimula la reabsorción ósea y la replicación celular ósea. El

EGF es conocido por acelerar la erupción del incisivo en animales recién nacidos, siendo producido por los fibroblastos y las células del estroma. (Uemalsu y col, 1996). Por su parte, el interferón gamma ($INF\gamma$) antagoniza los efectos de otras citoquinas y factores de crecimiento. Se ha encontrado que elimina completamente los efectos de reabsorción de la IL-1 y el TNF- α . Esta citoquina puede promover la fusión de las células progenitoras de los osteoclastos mientras modula los efectos sobre estas células de las citoquinas que promueven la reabsorción (Takayanagi y col, 2000).

Por otro lado se encuentran los factores generales de carácter hormonal que regulan la remodelación ósea, dentro de los cuales están las hormonas sistémicas, como la hormona paratiroidea, calcitonina, calcitriol, estrógenos, glucocorticoides, somatotrofina, hormonas tiroideas, insulina y leptina. Los estrógenos y la leptina serán parte de este estudio por que tienen interesantes proyecciones para el tratamiento de alteraciones en el remodelamiento óseo.

3.1 Estrógenos

Los estrógenos, han sido de gran interés debido a que son muy importantes para el metabolismo y crecimiento óseo. Su relación con la remodelación ósea fue descrita por Albright y col en el año 1947 al estudiar la pérdida de masa ósea en mujeres post menopáusicas, concluyendo que los estrógenos estimulaban a los osteoblastos y que al entregar a esas pacientes una terapia a largo plazo con progesterona disminuía el daño óseo.

La síntesis de estrógenos se realiza principalmente en las gónadas a partir de

esteroides C19. A pesar de que el estrógeno es considerado comúnmente como una hormona femenina, también es producida por las gónadas masculinas, aunque en menores cantidades. En el caso de las mujeres, su producción gonadal se mantiene hasta el desarrollo de la menopausia, punto en el cual los niveles de esta hormona disminuyen aproximadamente unas 20 veces, quedando en circulación el estrógeno producido por síntesis extragonadal en órganos como el hígado, tejido adiposo y tejido óseo. En la producción tanto en las gónadas como en los otros tejidos participa la enzima aromatasa (aromatase cytochrome P450), que convierte precursores como testosterona o androstenediona en estrógenos (Pino y col, 2006).

Los estrógenos tienen un doble efecto sobre el metabolismo óseo, ya que por un lado favorecen la formación ósea aumentando el número y la función de las células osteoblásticas y por otro son capaces de disminuir la reabsorción. Actualmente se han descrito dos mecanismos por los cuales el estrógeno actúa en la remodelación ósea. Ambos mecanismos dependen de la unión de los estrógenos a sus receptores específicos, ER α y ER β , los que se han encontrado tanto en osteoblastos, osteocitos y osteoclastos humanos (Komms BS y col, 1988; Thomkinson A, 1998).

El primer mecanismo se produce a través de la formación del complejo "estrógeno-receptor", el cual se une a regiones específicas del ADN, como los ERE (Estrogen Response Elements), los cuales al unirse a elementos coactivadores generan cambios en la maquinaria de transcripción de ADN (Deroo BJ, 2006). El segundo mecanismo se conoce como "no genotrópico", pues no depende de la unión del complejo "estrógeno-receptor" al ADN, sino de la activación de kinasas citosólicas dependientes de señales extracelulares (ERK-1 y ERK-2) (Deroo, 2006).

3.2 Leptina

Leptina es una molécula codificada por el gen *ob* y está formada por 167 aminoácidos. Es una hormona circulante secretada mayoritariamente por los adipocitos, y sobre la cual existen numerosos estudios que indican su efecto sobre diferentes células y tejidos, además de ser la responsable de regular la ingesta de alimento, el metabolismo, ritmos neuroendocrinos y de controlar el balance energético del organismo (Cirmanová y col, 2008).

Al igual que los estrógenos, la importancia de la leptina en la remodelación ósea está basada en estudios que asocian una menor incidencia de osteoporosis en mujeres posmenopáusicas con una mayor cantidad de tejido adiposo y, por tanto, mayores cantidades de leptina en el torrente sanguíneo. (Hadji P y col, 2000)

La acción de leptina ocurre en forma directa sobre los diferentes tipos celulares mediante su unión a receptores específicos de membrana denominados, según su tamaño, Ob-R (receptor corto), Ob-Rb (receptor largo) y Ob-s (receptor soluble). La unión de esta hormona a sus receptores genera un cambio conformacional que deriva en una serie de sucesos que finalizan en diferentes rutas de señalización intracelular (Tartaglia y col, 1995; Friedman y Halaas, 1998).

Desde que leptina fue identificada hasta el día de hoy, se han desarrollado numerosas investigaciones cuyo fin ha sido dilucidar su acción biológica y vía metabólica, su efecto en humanos delgados y obesos y los mecanismos que intervienen en su acción. La evidencia recopilada ha llevado a indicar a esta hormona,

principalmente, como un factor regulador de una gran variedad de procesos fisiológicos entre los cuales se encuentra el metabolismo óseo, pero su efecto sigue siendo un punto de gran controversia debido a la existencia de estudios que muestran resultados diametralmente opuestos.

Uno de los mecanismos de acción propuestos para la acción de la leptina en el metabolismo óseo es a nivel del sistema nervioso central, siendo su blanco de acción el hipotálamo, involucrando al receptor β_2 adrenérgico de la vía de señalización simpática, a través del cual genera una disminución de la actividad osteoblástica (Ducy y col 2000; Harada y Rodham 2003; Elefteriou y col 2005). El efecto observado por Ducy y col. en ratones *ob -/-* a los que se les administró leptina vía intracerebroventricular (ICV), fue una notoria disminución de la densidad mineral ósea (DMO), sin embargo al tratar ratones normales (control) con leptina, los investigadores no observaron ninguna alteración en la síntesis de colágeno o en la mineralización ósea, por lo que concluyeron que no existía una acción directa de leptina a nivel de los osteoblastos.

También se ha propuesto que leptina actúe directamente a nivel de los tejidos periféricos, entre los cuales se encuentra el tejido óseo. En este tejido, leptina actuaría promoviendo el desarrollo de células osteoprogenitoras y estimulando a los osteoblastos para la formación de hueso nuevo (Thomas y col, 1999a; Reseland y col, 2001; Cornish y col, 2002). Una de las evidencias más importantes que apoya este posible rol de leptina como un factor favorecedor de la osteogénesis está dado por el resultado obtenido del tratamiento con leptina en forma subcutánea de ratones *ob -/-*, el cual mostró una disminución de la adipogénesis versus un aumento de la osteogénesis

en la médula ósea (Hamrick y col, 2005). Otro experimento no menos importante fue el realizado con células de médula ósea humana tratadas con leptina, el cual mostró que la hormona promueve la diferenciación de estas células hacia osteoblastos formadores de hueso mientras inhibe su diferenciación hacia adipocitos. (Thomas y col, 1999b; Jaiswal, 2000; Hess y col, 2005)

Considerando toda la evidencia señalada, es posible sugerir que leptina posee un rol pro-osteogénico en las MSCs, influyendo en el control de la remodelación ósea. Además en los últimos años han surgido estudios que indican al sistema RANK/RANKL/OPG como un punto importante en la regulación del proceso de remodelación ósea (Lerner, 2006), por lo que es posible que leptina ejerza su acción reguladora sobre este sistema.

4. Sistema RANK/RANKL/OPG

La integración de las vías de regulación de la remodelación ósea es realizada por un conjunto de representantes de la familia TNF (*tumor necrosis factors*) que recibe el nombre de Sistema RANK/RANKL/OPG (receptor activador del factor nuclear (NF- κ B)/ligando de unión al Receptor Activador de NF- κ B/ Osteoprotegerina). Este sistema se encuentra íntimamente relacionado con la interacción existente entre las células progenitoras osteoblásticas y el proceso de diferenciación-activación de los osteoclastos.

4.1 Receptor activador del factor nuclear (NF- κ B) (RANK, ODFR)

Esta es una proteína transmembrana de 616 aminoácidos cuya función es ser el receptor celular específico de RANKL. Se expresa en diversos tipos celulares como por ejemplo: precursores hematopoyéticos, osteoclastos maduros, células B y T, células dendríticas y fibroblastos (Anderson y col 1997).

La activación de este receptor inicia una cascada de señales que aún no se conocen completamente (Ross y col, 2000) que genera una reorganización del citoesqueleto del osteoclasto, lo que permite que se lleven a cabo los cambios necesarios para la maduración, activación, movilidad y establecimiento de estas células en la superficie ósea donde se realizará la reabsorción. Además, genera las señales que permiten la supervivencia del osteoclasto maduro (Burgess y col, 1999).

Experimentos realizados con roedores carentes de este receptor muestran que la

falta de esta proteína deriva en osteopetrosis, ausencia total de osteoclastos y nódulos linfáticos, además de hipocalcemia e hipofosfatemia, lo que es un resultado muy similar al observado en ratones carentes de RANKL (Li y col, 2000).

4.2 Ligando de unión al Receptor Activador de NF- κ B (RANKL)

El ligando de unión al Receptor Activador de NF- κ B conocido también como RANKL, TRANCE, OPG-L y ODF es una proteína de 317 aminoácidos, que se encuentra en células del estroma, condrocitos y células endoteliales. Se encuentra como proteína asociada a membrana o soluble. Esta última, deriva de la forma unida a membrana como resultado de "splicing" alternativo, secretada por células del linaje osteoblástico y linfocitos T activados (Boyce y Brendan, 2007). Además, se ha observado que esta proteína se encuentra sobreexpresada en células tumorales malignas y está involucrada en la destrucción de hueso en pacientes con cáncer (Wittrant y col, 2004).

La expresión de esta proteína es regulada a nivel transcripcional, traduccional y post-traduccional por hormonas como hormona paratiroídea, la vitamina D y por factores de crecimiento, y citoquinas (Suda y col 1999).

Estudios *in vitro* muestran que esta proteína junto al factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) son necesarios y suficientes para estimular la diferenciación, supervivencia y fusión de los precursores de osteoclastos, siendo también responsables de activar la maduración y prolongación de la vida de estas células,

mediante la inhibición de la apoptosis, con lo que favorece la formación de lagunas de reabsorción ósea (Yasuda y col, 1998). Estudios sobre el mecanismo de acción de esta proteína muestran que un exceso de RANKL produce un incremento de la formación de osteoclastos, lo que deriva en una osteoporosis masiva. Por otra parte, una disminución de la proteína genera osteopetrosis debido a la ausencia de osteoclastos maduros (Hofbauer, 2001).

Se han realizado ensayos en los que se ha encontrado que leptina podría jugar un papel muy importante en la remodelación del hueso a través de un efecto directo en la modulación del balance de OPG/RANKL. En estos ensayos se demostró que la expresión del ARNm de RANKL en osteoblastos es dependiente de la concentración de leptina, y si la concentración de la hormona es muy elevada (i.e sobre 12 ng/mL), la expresión del ARNm es inhibida. Lo mismo ocurre con la expresión de la proteína soluble (sRANKL). Este resultado estaría indicando que leptina modula en forma positiva el balance OPG/RANKL inhibiendo la expresión de RANKL (Lamghari y col, 2006). Además, la administración intracerebroventricular de leptina en ratones induce la expresión de RANKL en las células progenitoras de osteoblastos (Elefteriou y col 2005).

4.3 Osteoprotegerina (OPG)

Conocida por su sigla OPG, Osteoprotegerina, es uno de los miembros más nuevos de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR), también conocida como el factor de inhibición de la osteoclastogénesis (OCIF). Su síntesis se

inicia con un péptido de 401 aminoácidos, el cual es modificado posteriormente hasta transformarse en una proteína madura de 380 aminoácidos. La proteína madura no cuenta con los dominios transmembrana del precursor y es secretada como proteína soluble (Simonet y col, 1997). Diversos estudios muestran que su ARNm se encuentra en diversos tejidos como por ejemplo riñones, hígado, médula ósea y hueso (Wada y col, 2006).

En el hueso, OPG es producida y secretada por los osteoblastos, y es en este tejido donde realiza su función principal. Inhibe la maduración de los osteoclastos, su posterior activación y promueve su apoptosis, actuando como receptor señuelo de RANKL, impidiendo de esta forma la unión de este último a su receptor RANK presente en la membrana de los osteoclastos. (Kostenuik, Paul J, 2005; Hofbauer, 2001).

Estudios *in vivo* con ratones *knock out* para OPG, han mostrado que estos roedores sufren una pérdida de masa ósea lo que deriva finalmente en el desarrollo de una severa osteoporosis (Mizuno y col 1998). Por otro lado, la sobreexpresión de OPG deriva en roedores con osteopetrosis, esto significa que presentan un incremento sustancial de la densidad ósea, demostrando que OPG tiene un papel crucial en el metabolismo óseo (Simonet y col, 1997).

Investigaciones recientes han demostrado que los estrógenos pueden aumentar los niveles de OPG en líneas celulares estromáticas de ratón (Saika y col, 2001) y en ratones ovariectomizados a través de la activación del receptor α de estrógeno (Linberg y col, 2001), lo que produce la inhibición de la reabsorción, demostrándose que estas hormonas sexuales juegan un rol importante en la osteoclastogénesis (Hofbauer y col, 1999). Además se ha demostrado que células mononucleadas humanas tratadas con

la hormona leptina tienen un incremento en el ARNm de OPG, lo que deriva en una inhibición de la osteoclastogénesis (Holloway y col, 2002).

4.4 Interacción RANK/RANKL/OPG

Bajo condiciones fisiológicas normales, el desarrollo de los osteoclastos requiere del contacto célula-célula entre los osteoblastos y los precursores osteoclastícos. Este contacto proporciona el ambiente necesario para que las moléculas involucradas en el sistema RANK/RANKL/OPG activen las cascadas de señalización al interactuar entre sí.

Normalmente, los osteoblastos responden a estímulos como la vitamina D, la hormona paratiroidea (PTH) y citoquinas expresando RANKL en su membrana, el cual al entrar en contacto con su receptor específico RANK ubicado en la membrana de precursores hematopoyéticos, provee una señal crucial para conducir el desarrollo de éstos a precursores osteoclastícos, así como también para activar osteoclastos maduros (Romas y col 2002) (Figura 3). Pero RANKL no es la única proteína expresada por los osteoblastos, ya que estas células son también responsables de la síntesis de OPG. Cabe mencionar que la mayoría de los factores que modulan a RANKL afectan inversamente la síntesis de OPG (Boyce B, 2007).

Diversos estudios muestran que tanto la obesidad como la menopausia afectan la densidad mineral ósea y por tanto al sistema RANK/RANKL/OPG. Esto sugiere que factores asociados al tejido adiposo y a las hormonas sexuales, entre otros, estarían

afectando el metabolismo óseo. Leptina y estrógeno, además de tener otras importantes funciones como reguladores del metabolismo, estarían entonces íntimamente ligadas al proceso de remodelación ósea a través de la regulación de la expresión de RANKL y OPG, que son parte fundamental en la integración de señales que permiten la diferenciación, activación, mantención y supervivencia de las células implicadas en el remodelamiento óseo. Sin embargo, los estudios presentados como antecedentes sobre la regulación del sistema RANK/RANKL/OPG con respecto a las hormonas leptina y estrógenos se han hecho en forma separada, en diferentes tipos celulares y en diferentes ventanas de tiempo.

Mediante el uso de las técnicas de Western blot y RT-PCR, esta tesis intenta dilucidar de forma comparable el efecto directo, en conjunto y por separado, de estas dos hormonas sobre la expresión de RANKL y OPG en cultivos de MSCs obtenidas de mujeres postmenopáusicas, aportando de esta forma a una mejor comprensión del funcionamiento de estas vías de regulación que podrían estar implicadas en diversas alteraciones óseas

Mecanismo de acción de OPG y RANKL

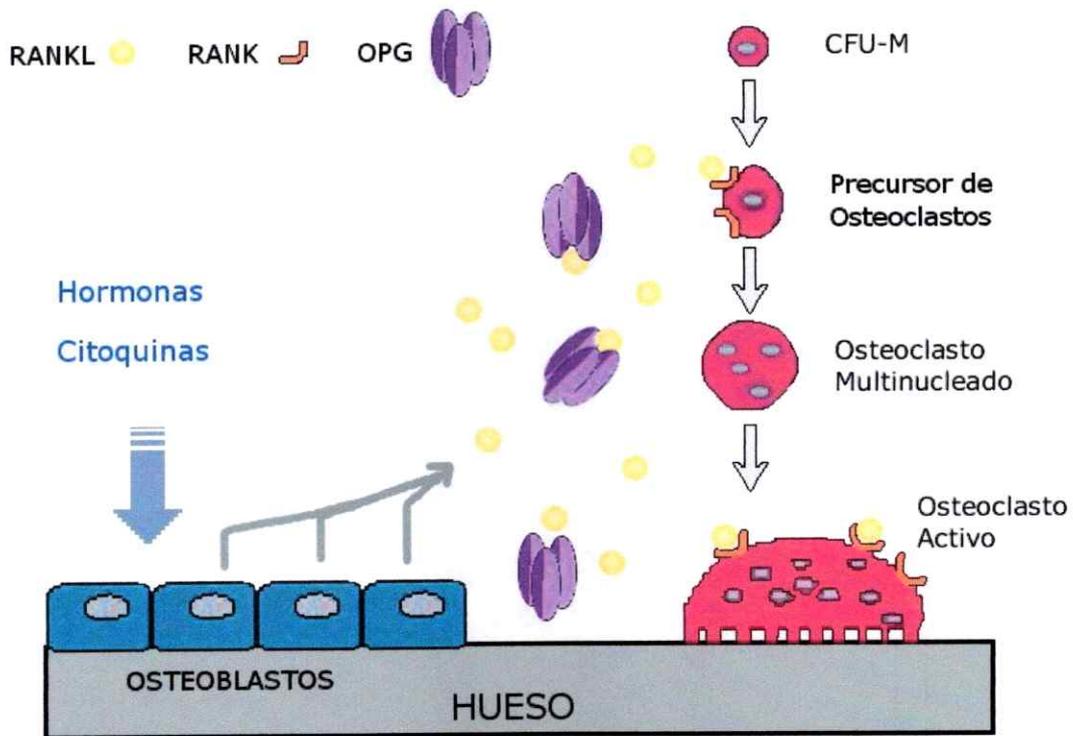


Figura 3 Esquema del mecanismo de acción de OPG y RANKL. Hormonas pro-reabsorción, citoquinas y factores de crecimiento actúan a través de sus receptores en los osteoblastos y otras células para inducir la producción de RANKL. Algunos de estos factores también suprimen la producción de OPG, lo que incrementa la relación RANKL/OPG. Cuando este ratio es alto, el RANKL libre es capaz de activar RANK en los precursores de osteoclastos y estimular su fusión y diferenciación a osteoclastos maduros. El RANKL libre también activa a los osteoclastos maduros para hincar la reabsorción ósea y protegerlos de la apoptosis. Cuando RANKL se une a OPG se produce un rápido cese de la formación osteoclástica, activación y supervivencia de estas células. Figura modificada del paper de Paul J Kostenuik *Osteoprotegerin and RANKL regulate bone resorption, density, geometry and strength*. *Current Opinion in Pharmacology* 2005, 5:618–625.

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Durante el proceso de remodelación ósea, las células progenitoras mesenquimáticas (hMSC) presentes en la médula ósea responden a la acción de leptina y estrógeno modulando el sistema OPG/RANK/RANKL.

III. OBJETIVO GENERAL Y ESPECIFICOS

1. Objetivo general

Estudiar si el efecto de leptina y/o estrógeno sobre el tejido óseo puede explicarse a través de su acción sobre el sistema OPG/RANK/RANKL.

2. Objetivos específicos

a. Determinar si leptina y estrógeno regulan los niveles proteicos de RANKL y OPG en las células progenitoras mesenquimáticas humanas en condiciones de diferenciación osteogénica.

b. Determinar si leptina y estrógeno regulan los niveles de ARNm para RANKL y OPG en células progenitoras mesenquimáticas humanas en condiciones de diferenciación osteogénica.

c. Determinar si leptina y estrógeno afectan la razón RANKL/OPG en condiciones de diferenciación osteogénica.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Donantes

Las donantes fueron seleccionadas en la sección de traumatología del Hospital Sótero del Río en Santiago y corresponden a mujeres posmenopáusicas en un rango que se encuentra entre los 65 y 86 años de edad, que requerían una cirugía ósea como parte de su tratamiento. Se les solicitó ser donantes voluntarias de médula ósea y dieron su autorización mediante la firma de un consentimiento informado escrito. La aprobación ética del procedimiento fue autorizado por los Comité de Etica del Hospital Sótero del Río y del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA). Se adjunta copia del Consentimiento Informado.

Las donantes eran mujeres sanas, y no recibían ningún tipo de terapia de reemplazo hormonal.

Esta tesis se realizó en el marco del proyecto Fondecyt 1050930.

2. Obtención y purificación de MSC

La obtención de células troncales mesenquimáticas (MSC), fue realizada mediante la aspiración de médula ósea de la cresta ilíaca de las donantes, durante la cirugía a la que son sometidas como parte del tratamiento (Rodríguez et al,1999),

obteniéndose un volumen aproximado de 10 a 20 mL por muestra. La obtención de las MSC según un procedimiento descrito anteriormente (Jaiswal et al , 1997) en el cual se agrega a las muestras obtenidas 20 mL de DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium, Sigma, St Louis, MO, USA) suplementado con 10% Suero Fetal Bovino (SF, Hyclone, falta ciudad, país) (Medio basal, MB). La mezcla obtenida es centrifugada durante 5 minutos a una velocidad de 1800 rpm, obteniéndose un pellet libre de grasa y que contiene las MSC. Las células colectadas son resuspendidas en 10 mL de DMEM-10%SF con 80 ug/mL de gentamicina, y colocadas en un gradiente de Percoll al 70 % (Sigma). El gradiente se centrifuga a 1600 rpm por 15 minutos, luego de lo cual se forman tres fases o fracciones; la primera fase o fracción superior, con una concentración de 1,03 gr/mL, la segunda fase o fracción media con una concentración de 1,10 gr/mL, y la tercera fase o fracción inferior con una concentración de 1,14 gr/mL. Las MSC se obtienen a partir de la primera fase, y luego de tres lavados con DMEM-10%SF son sembradas a una densidad aproximada de $3,63 \times 10^4$ cél/cm² (cultivo primario), y cultivadas en una atmósfera humidificada de 5% CO₂ y 37 °C. Después de 4 días las células no adherentes son removidas y se añade medio fresco de cultivo. El MB fue reemplazado por medio fresco 2 veces a la semana.

3. Expansión in Vitro MSC

Una vez que las células han alcanzado confluencia, con una densidad aproximada de $4-5 \times 10^6$, son liberadas de la placa por un tratamiento con una solución

de tripsina 0,25%-EDTA, a 37 °C por 5 minutos y centrifugadas a una velocidad de 1800 rpm durante 5 minutos. Luego de esto, las células son lavadas con PBS 1X (Phosphate-Buffered-Saline de pH 7,2; el cual contiene NaCl 0,14 M; KCl 2,6 mM y Na_2HPO_4 1,7 mM), resuspendidas en medio DMEM-10%SF y sembradas en placas de 100 mm, a una densidad de $3,63 \times 10^4$ células/cm². Esta etapa se conoce como primer subcultivo. Los experimentos de esta tesis fueron realizados con células que se encontraban en quinto subcultivo, a no ser que se especifique algo diferente.

4. Diferenciación Osteogénica de MSC

Las MSC fueron sometidas a un estímulo de diferenciación osteogénica, durante diferentes períodos de tiempo: 0, 24, 48, 72, 120 y 168 horas. Para esto, las células fueron lavadas con PBS 1X, y el medio de cultivo basal fue reemplazado por medio osteogénico (MO), el cual contiene DMEM-10%SF, dexametasona 100nM, b-glicerolfosfato 10 mM y 50 µg/mL de ácido ascórbico. Este último se agrega diariamente al momento de ser utilizado.

Para estudiar el efecto de la hormona leptina y androstenediona, se realizaron experimentos de diferenciación osteogénica a los cuales se les adicionó leptina y/o androstenediona al medio en una concentración de 1 ng/mL de leptina recombinante humana (Chemicon Internacional inc, Temecula, CA) y 100 nM de androstenediona (Sigma), durante los tiempos indicados anteriormente, con un recambio de MO dos veces a la semana (Pino y col, 2006).

5. Análisis de fosfatasa alcalina por citoquímica.

Para verificar la diferenciación de los cultivos hacia linaje osteogénico, las células son lavadas 3 veces con TBS 1X. Luego las células son fijadas a la placa aplicando una solución de etanol-formaldehído (9mL etanol y 1mL de formaldehído 37%) por 30 segundos. Luego la placa debe lavarse 3 veces con TBS 1X. Se adiciona Buffer de Reacción (NaCl 100mM, MgCl₂ 5mM, Tris100mM) con NBT (Nitro Blue Tetrazolium, 100mg/mL) y BCIP (Bromo-Chloro-Indolyphosphate, 50mg/mL), y se incuba durante 20 minutos en oscuridad. Finalmente la placa es lavada con PBS o TBS 1X.

6. Lisis Celular

Luego de recibir los estímulos en los tiempos especificados en los experimentos, las células se lavan con PBS frío y son incubadas con buffer RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% deoxicolato, 0,1% SDS), por 5 minutos, luego son lisadas mecánicamente utilizando un Cell Scraper. Luego el lisado se centrifuga a 14.500 rpm durante 15 minutos para separar el material insoluble, y el sobrenadante con las proteínas es recolectado y almacenado con 0,5 mM de PMSF, 0,5 mM de ortovanadato de sodio, 2 µg/mL de leupeptina, 1 µg/mL de pepstatina y 2 µg/mL de aprotinina a una temperatura de -20°C. La cantidad de proteínas presentes en los lisados se midió utilizando un kit comercial de determinación de proteínas (Bio-Rad Laboratorios, Hercules,CA,USA).

7. Análisis de Western Blot para RANKL y OPG

Para esto, 20 µg de lisado celular son denaturados en buffer de carga (SDS 2%, glicerol 10%, Tris 0,06 M (pH 6,8), azul de bromofenol 0,01%, β-mercaptoetanol 20%) por 5 minutos a 100 °C. La separación de las proteínas se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE: Bio-Rad). Para la separación de las proteínas OPG y RANKL el gel utilizado fue al 10% y con espesor de 1,5mm. Luego de la separación en el gel, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (Perkin Eimer Life Science, Boston, MA, USA), durante 60 min a 100 V. Una vez finalizada la transferencia, las membranas se bloquearon toda la noche con una solución al 7% de leche descremada en TBS-Tween 0,05%, sin agitación a 4°C, para posteriormente ser incubadas con su correspondiente anticuerpo primario diluido en buffer de bloqueo (Anticuerpo α-OPG, dilución 1:1000; Anticuerpo α-TRANCE, dilución 1:1000; anti β-Actina, dilución 1:5000, Sigma) durante dos horas a 20°C. Luego de la incubación, se realizaron 3 lavados con TBS-Tween 0,05%, al término de los cuales se incubó con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa a una dilución de 1:5000 (anti-mouse) con buffer de bloqueo durante 1 hora a 20°C. Las bandas fueron visualizadas mediante un kit de quimioluminiscencia de la empresa Perkin Elmer, y reveladas utilizando películas radiográficas de calidad estándar AGFA, y Membranas de calidad Sensible Hyperfilm de Amersham Biosciencias.

La intensidad de las bandas obtenidas en las membranas fue analizada mediante el programa Kodak Digital 1D, y la identificación de las bandas en estudio fue mediante el peso molecular correspondiente a cada proteína.

8. Extracción de ARN y RT-PCR

Para los experimentos de RT-PCR se sembraron células en placas de 60mm (Nunc), a una densidad de $2,38 \times 10^4$ cél/cm². Una vez que las células llegaron a confluencia, fueron liberadas de la placa por un tratamiento suave con tripsina, como se explicó con anterioridad, y centrifugadas a 2050 rpm por 5 minutos. Al pellet resultante se le agregó 1 mL de Trizol (Ambion, Austin, TX, USA), realizándose la extracción del ARN según el protocolo del fabricante. Una vez extraído, el ARN fue cuantificado en un espectrofotómetro (MBE2000, Perkin Elmer, Boston MA), y luego se almacenó a una temperatura de -80 °C.

Para verificar la integridad del ARN, se utilizó geles denaturantes de agarosa (Fermelo Biotec, Chile), los cuales se componen de una mezcla de 0,72 gr de agarosa disueltos en 45 mL de agua DPEC, a la cual, una vez alcanzados los 65°C se le agrega otra mezcla compuesta por MOPS 10X (MOPS 0,4 M pH 7.0, Winkler Ltda.; acetato de sodio 0,1 M, Winkler Ltda.; EDTA 0,01 M, MERCK) y formaldehído al 37%.

Las muestras a analizar constan de 4 µL de ARN, 6 µL de agua libre de nucleasas (Mo Bio, Carlsbad, CA), 9 µL de formamida (Winkler), 3 µL de formaldehído 37%, 2µL de MOPS 10X y 0,5 µL de bromuro de etidio (Winkler). Para realizar la carga del gel, las muestras son denaturadas a 70°C por 10 minutos, y finalmente enfriadas en hielo por 2 minutos. Una vez cargadas las muestras en el gel, éstas se corrieron por 40 minutos a 80 V.

La síntesis de ADNc se realizó utilizando transcriptasa reversa M-MLV (Promega, Madison, WI, USA), mediante un ciclo de 15 minutos a 45°C, enfriamiento en hielo por

5 minutos, y una extensión de 45 minutos a 70°C. Las reacciones de PCR se realizaron amplificando 300 ng de ADNc con 30 µL de una mezcla de reacción (3 µL de buffer de reacción 10X, Invitrogen; 0,9 µL MgCl₂, Invitrogen; 0,6 µL de cada partidor, 22,3 µL de agua libre de nucleasas; 0,6 µL de dNTPs, Omega Bio-Tek, Doraville, GA, USA; 0,5 µL de Taq polimerasa, Invitrogen). La secuencia, tamaño de los producto y la correspondiente *temperatura de melting* o de separación de las hebras (T_m) de los partidores utilizados en esta tesis se resumen en la tabla 1. Los productos obtenidos a partir del RT-PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1,2%.

Tabla de partidores utilizados para amplificación por RT-PCR

Gen	Primer		T _m	Nº Ciclos	Tamaño Fragmento (pb)
RANKL	sense	AGCACATCAGAGCAGAGAAAGC	54	37	485
	antisense	CAGTAAGGAGGGGTTGGAGACC			
OPG	sense	GTGTCTTTGGTCTCCTGCTAA	55	39	291
	antisense	GGGCTTTGTTTTGATGTTTC			
GPDH	sense	ACCACAGTCCATGCCATCAC	60	29	452
	antisense	TACAGCAACAGGGTGGTGGA			
Colágeno 1	sense	CAAAGGCAATGCTCAAACAC	56	39	275
	antisense	TGCGGCACAAGGGATGACA			
OC (osteocalcina)	sense	CGCAGCCACCGAGACACCAT	56-59	39	400
	antisense	TTCTTTCCTTCCCCTTGCCCT			

Tabla 1. Partidores utilizados para la amplificación por PCR. Se indican los partidores sentido y antisentido. pb, pares de bases.

9. Análisis estadístico

Para evaluar el efecto de los estímulos de leptina y androstenediona en los niveles de las proteínas RANKL y OPG de cultivos hMSC, se realizó un análisis de comparación de medias con prueba t-Student para variables relacionadas e independientes. El análisis independiente se utilizó para estudios transversales y el análisis para variables relacionadas se utilizó para estudios longitudinales. Para realizar el análisis t-Student, se utilizó el programa estadístico SPSS 15.

V. RESULTADOS

1. Establecimiento de cultivos de MSCs de donantes osteoporóticas

En la realización de esta tesis se utilizaron células troncales mesenquimáticas de donantes posmenopáusicas, obtenidas mediante aspiración de médula ósea y cultivada según lo descrito en el capítulo de Materiales y Métodos. Las MSCs presentaron morfología de tipo fibroblasto (Figura 4A). Debido al bajo porcentaje de MSC presentes en las muestras, fue necesario amplificar los cultivos para obtener el número de células requeridas en los experimentos.

Se realizaron cinco subcultivos para eliminar otros tipos celulares que pudiesen encontrarse en los cultivos primarios de la muestra y así lograr un alto grado de homogeneidad para los experimentos de diferenciación osteogénica.

2. Diferenciación osteogénica de MSCs

Para verificar la diferenciación al linaje osteogénico de las muestras de MSCs luego de ser cultivadas con el medio de diferenciación osteogénico (MO), se realizó la prueba de fosfatasa alcalina (FAL) para verificar la existencia de la enzima en el cultivo además se observó la presencia de los marcadores de diferenciación osteogénica colágeno tipo I (Col I) y osteocalcina (OC), mediante la técnica de PCR. Las muestras resultaron positivas para la prueba de fosfatasa alcalina y para ambos marcadores indicando que la diferenciación resultó exitosa (Figuras 4 y 5).

hMSC en cultivo

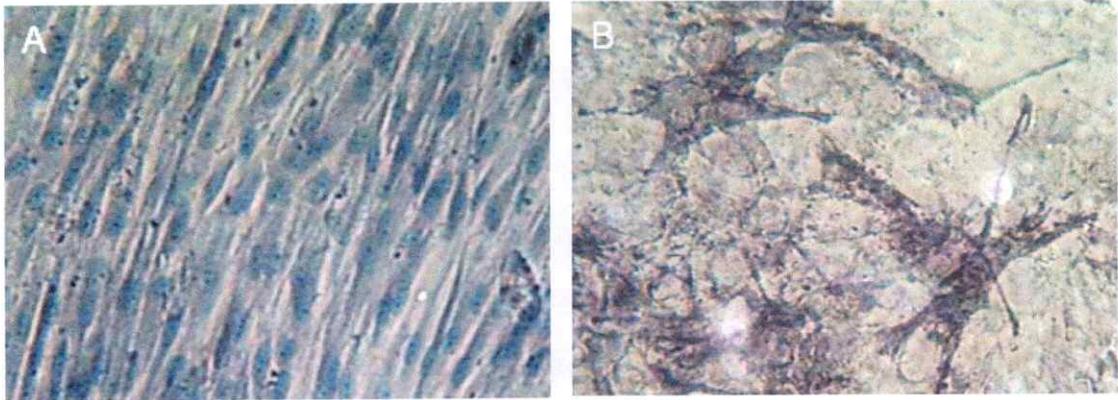


Figura 4. A) **hMSC en cultivo.** Fotografía microscopio contraste de fases donde se observa la forma tipo fibroblasto de las células troncales mesenquimáticas en cultivo primario obtenidas de donantes postmenopausicas (10X). B) Prueba de fosfatasa alcalina (FAL) aplicada a un cultivo de hMSC, la tinción en tono morado indica la presencia de fosfatasa alcalina en el cultivo, verificando su diferenciación a linaje osteogénico.

Expresión de Colágeno tipo 1 y Osteocalcina

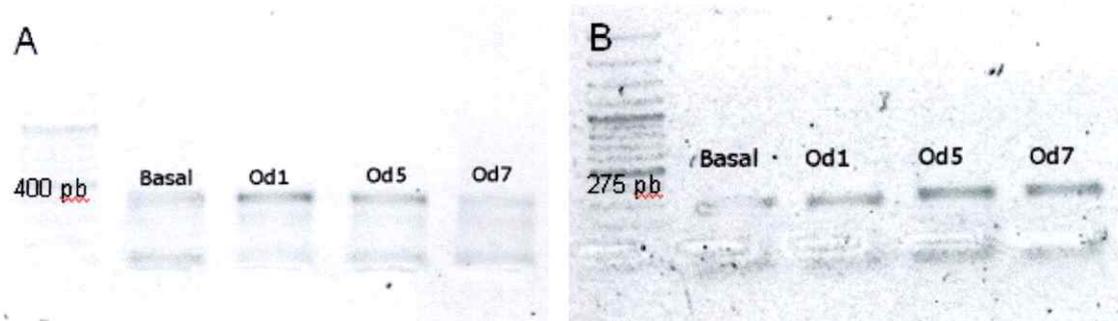


Figura 5. Expresión de Colágeno tipo 1 y Osteocalcina en cultivos hMSC diferenciados a linaje osteogénico. A) Expresión del transcrito Osteocalcina utilizando los partidores señalados en la Tabla I. B) Expresión del transcrito Osteocalcina utilizando los partidores señalados en la Tabla 1. En ambas imágenes se expresa el peso del producto obtenido en pb (pares de bases).

3. Análisis de la expresión de las proteínas RANKL y OPG en cultivos de MSC en diferenciación osteogénica.

Las hormonas leptina y estrógeno son efectores sobre la remodelación ósea. Esta función la podrían realizar regulando los niveles de RANKL y/o OPG. En el presente estudio, cultivos de MSCs de mujeres posmenopáusicas fueron expuestas a medio de diferenciación (grupo control), y a estímulo de leptina y/o androstenediona para analizar la expresión de RANKL y OPG en condiciones controladas. La leptina es agregada en su forma activa, mientras que la androstenediona es un precursor de estrógenos, por lo cual debe ser transformada a la forma activa a través de la enzima aromatasa (Rodríguez y col, 2006) en el mismo cultivo. Cabe hacer mención, de que el uso del precursor de estrógenos androstenediona en los siguientes experimentos se debe al interés de analizar el efecto de la producción in situ de estrógenos gracias a la enzima aromatasa.

La expresión de las proteínas RANKL y OPG se monitoreó en medio osteogénico suplementado con leptina, androstenediona o ambos, en intervalos de tiempo correspondientes a 0, 1, 5 y 7 días.

3.1 Expresión de proteína RANKL

RANKL es una de las proteínas expresadas por los osteoblastos y se une a su receptor RANK en la membrana de los precursores osteoclasticos, permitiendo su maduración y activación.

Para estudiar en forma controlada el comportamiento de RANKL se analizaron cultivos de MSC que sólo recibieron el estímulo de diferenciación osteogénica. Los resultados obtenidos a partir de estos cultivos muestran que existe una tendencia a un aumento de los niveles de RANKL durante la diferenciación osteogénica con respecto a sus valores basales correspondientes, de aproximadamente un 19% y un 30% en los días 1 y 5 de diferenciación respectivamente, disminuyendo en el día 7 hasta prácticamente recuperar el valor basal.

Debido a que existen estudios que han demostrado un rol inhibitorio de la leptina sobre la expresión de RANKL, se decidió observar su efecto en cultivos de MSCs de pacientes postmenopáusicas, a los que se les expuso a un estímulo controlado de leptina (1ng/mL). Los resultados obtenidos mostraron que estos cultivos tienden a disminuir los niveles de RANKL con respecto a los niveles observados en condiciones basales, de aproximadamente un 30%, 20% y 5% para los días 1, 5 y 7 respectivamente (figura 6 A). A partir de estos resultados podemos asumir que el nivel de RANKL en los cultivos de células osteoblásticas sufre un cierto grado de inhibición en presencia de leptina, pero parece aumentar en condiciones normales de diferenciación.

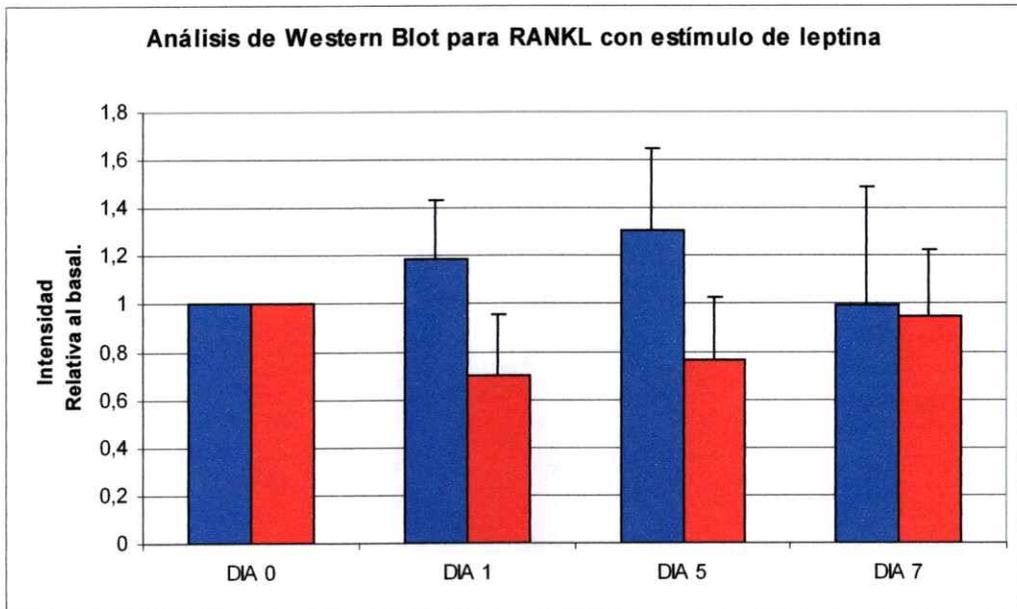


Figura 6A: Cuantificación de los niveles de la proteína **RANKL** en cultivos hMSC en medio de diferenciación osteogénico con y sin estímulo de leptina, utilizando la técnica de Western blot (n=6). **Control** (Azul) y **leptina** (1ng/mL) (Rojo). El Valor Relativo indicado en eje Y, corresponde a la a la razón de las medias con su respectivo valor basal, lo que entrega la cantidad de veces que ha aumentado o disminuido la proteína en estudio. Valor Media D0=0,21.



Figura 6A.2: Imagen de un gel de Western Blot representativo de los experimentos realizados para RANKL, las letras OD y OD+L indican diferenciación osteogénica y diferenciación osteogénica con estímulo de leptina respectivamente, el número que las acompaña indica el día de diferenciación de la muestra.

Además del efecto de leptina sobre la expresión de la proteína RANKL, se realizó un estudio del efecto del precursor de estrógenos androstenediona y su efecto en conjunto con leptina. A pesar del intento realizado en estos experimentos, no fue posible contar con el número de células necesarias para llevar a cabo los triplicados,

por lo que los resultados que se presentan corresponden a un único cultivo por tratamiento y deben considerarse preliminares.

La información obtenida a partir del cultivo tratado con androstenediona muestra una baja muy leve de RANKL con respecto al basal, y que bordea el 10%, pero esto se revierte considerablemente al día 7 de diferenciación, día en que es posible observar un aumento de aproximadamente un 60% de la proteína RANKL. Por otro lado, los datos entregados por el cultivo estimulado con leptina y androstenediona muestran para los días 1 y 5, un nivel muy similar al basal mientras que el día 7 muestra una baja para RANKL de alrededor de un 20 % (Figura 6B).

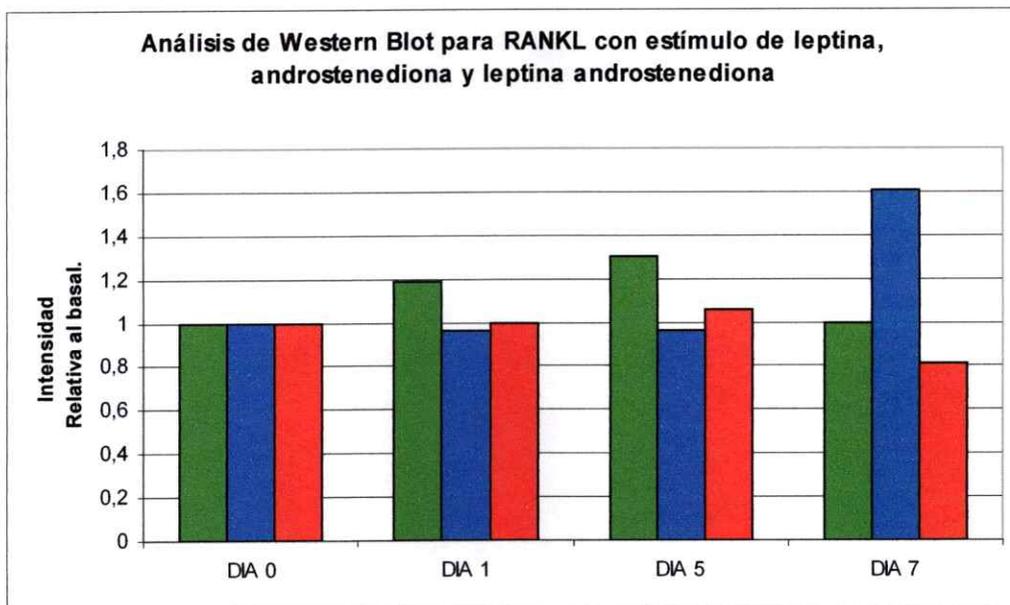


Figura 6B: Cuantificación de los niveles de la proteína RANKL en cultivos hMSC en medio de diferenciación osteogénico con estímulo de androstenediona (100nM) y leptina androstenediona (1 ng/mL y 100 nM respectivamente) utilizando la técnica de Western Blot (n=1). **Control** (verde), **androstenediona** (Azul) y **leptina y androstenediona** (Rojo). El Valor Relativo indicado en eje Y, corresponde a la a la razón de las medias con su respectivo valor basal, lo que entrega la cantidad de veces que ha aumentado o disminuido la proteína en estudio. Valor Media D0=0,21.

Es interesante mencionar que el aumento tardío de RANKL observado en presencia de androstenediona podría estar sugiriendo un posible retraso en el inicio de la remodelación ósea en caso de existir una concentración suficiente de estrógeno, debido al efecto inhibitorio sobre RANKL afectando por ende la acción crucial de esta proteína en la diferenciación y activación osteoclástica.

3.2 Expresión de proteína OPG

OPG es otra proteína expresada por los osteoblastos y actúa capturando a RANKL, impidiendo de esta forma su unión a RANK. Existen estudios que demuestran un incremento en los niveles del ARNm de OPG en presencia de leptina, sin embargo no es posible afirmar ese efecto en los niveles de proteína. Es por esto que se realizó el estudio del comportamiento de esta proteína bajo los estímulos ya mencionados. Nuestros resultados indican que los cultivos control tienen un pequeño aumento de OPG, de alrededor de un 10% al día 1, pero luego sufren una disminución poco significativa de la proteína en los días 5 y 7. Mientras tanto, en los cultivos de MSCs expuestos al estímulo de leptina, OPG muestra una disminución de cerca de un 25%, 15% y 30% con respecto al valor basal en los días 1, 5 y 7. Además al realizar una comparación entre los cultivos control y los cultivos en presencia de leptina es posible observar un pequeño efecto inhibitorio de leptina sobre OPG (figura 7A). Esto podría estar indicando que el efecto de leptina en la inhibición de la reabsorción ósea no estaría ocurriendo solo por un efecto inhibitorio sobre RANKL como se esperaba según los datos publicados por otras investigaciones, sino que al mismo tiempo actuaría inhibiendo OPG.

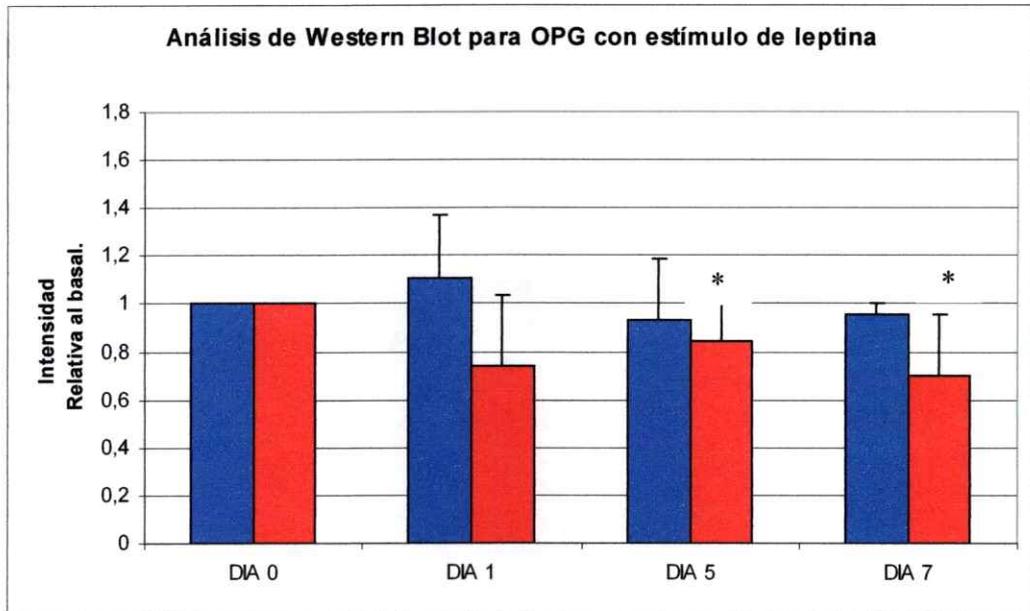


Figura 7A Cuantificación de los niveles de la proteína **OPG** en cultivos hMSC en medio de diferenciación osteogénico con y sin estímulo de leptina (1ng/mL), utilizando la técnica de Western Blot (n=6). **Control** (Azul) y **leptina** (Rojo). El Valor Relativo indicado en eje Y, corresponde a la a la razón de las medias con su respectivo valor basal, lo que entrega la cantidad de veces que ha aumentado o disminuido la proteína en estudio. Las diferencias observadas en los días 5 y 7 con respecto al Día 0 correspondiente son significativas ($p < 0,05$). Valor Media D0=0,35.



Figura 7A.2: Imagen de un gel de Western Blot representativo de los experimentos realizados para OPG, las letras OD y OD+L indican diferenciación osteogénica y diferenciación osteogénica con estímulo de leptina respectivamente, el número que las acompaña indica el día de diferenciación de la muestra.

Luego de observar el efecto de leptina sobre OPG se consideró interesante analizar el efecto de los estrógenos sobre esta proteína, debido a que se ha demostrado que estas hormonas sexuales pueden aumentar la expresión de OPG. Los resultados de Western Blot para la expresión de OPG en presencia de

androstenediona indican una disminución de la proteína en un 35 a 40% con respecto a la expresión basal en los días 1 y 5. Sin embargo esta condición es revertida al pasar un período más largo de estimulación, pues al día 7 se aprecia un aumento cercano al 50% (figura 2B). Por otra parte, el cultivo con tratamiento conjunto de leptina y androstenediona muestra un pequeño aumento de un 13% en el día 1, seguido de una baja no superior a un 12% en el día 5. A tiempos más largos, el cultivo tiende a incrementar la cantidad de OPG, llegando a sobrepasar su valor basal en un 60% aproximadamente, como se observa en el día 7 (figura 7B). Debido al incremento producido en la cantidad relativa de OPG en ambos cultivos al día 7 es posible sugerir que para observar en forma mas clara el efecto de estrógenos sobre la síntesis de OPG en este tipo de cultivos celulares, se requiere de experimentos con ventanas de tiempo mas extensas que la proporcionada en este estudio.

Es importante mencionar que al igual que ocurrió en los experimentos de RANKL para estos dos estímulos, estas mediciones no cuentan con triplicado por las razones explicadas con anterioridad. Pese a esto, este resultado preliminar, es interesante sobretodo en el efecto observado del tratamiento en conjunto de leptina y androstenediona, por lo cual se profundizará su análisis utilizando la técnica de PCR.

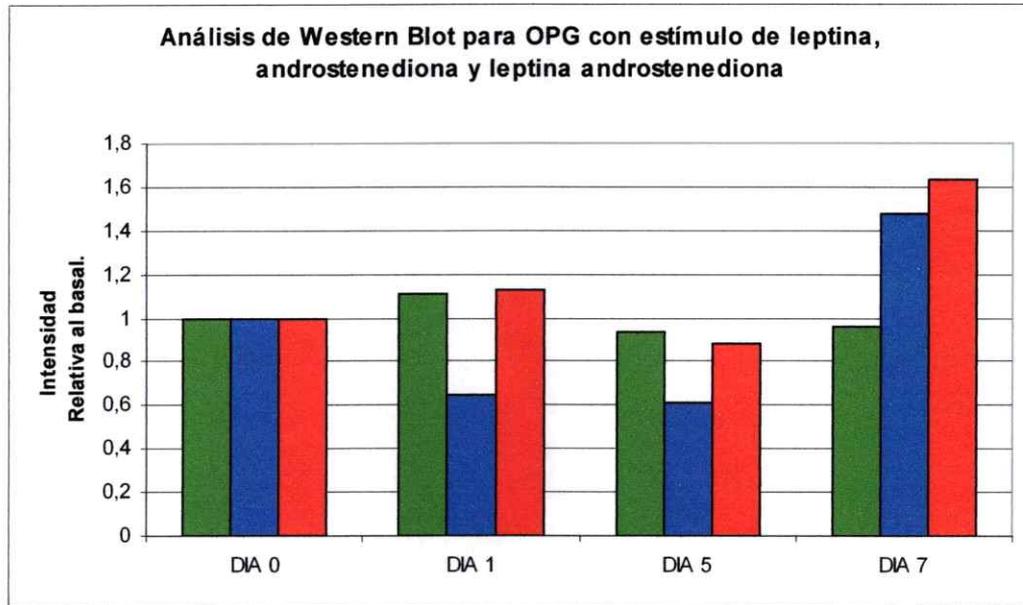


Figura 7B: Cuantificación de los niveles de la proteína **OPG** en cultivos hMSC en medio de diferenciación osteogénico, con y sin estímulo de androstenediona y leptina androstenediona (1 ng/mL y 100 nM respectivamente) utilizando la técnica de Western Blot (n=1). **Control** (verde), **androstenediona** (Azul) y **leptina androstenediona** (Rojo). El Valor Relativo indicado en eje Y, corresponde a la a la razón de las medias con su respectivo valor basal, lo que entrega la cantidad de veces que ha aumentado o disminuido la proteína en estudio. Valor Media D0=0,35.

3.3 Relación RANKL/OPG

Debido al rol secuestrador de OPG sobre RANKL, se consideró estudiar la relación RANKL/OPG como indicador de desequilibrios en la reabsorción ósea, debido a que los cambios en esta relación pueden ser considerados como referencia de los niveles de diferenciación y activación osteoclastica (Basem y col, 2002). La relación entre RANKL y OPG fue analizada para determinar si es posible observar algún tipo de cambio importante en el equilibrio de las dos proteínas.

La relación RANKL/OPG obtenida a partir de los datos de las muestras control revela una tendencia al incremento en todos los días analizados. La relación en el día 1

refleja un incremento discreto que no supera el 7% respecto del basal, el día 5 por su parte muestra un incremento máximo de 40% respecto al basal y en el día 7 se observa que la relación prácticamente retorna al valor basal, pero que se mantiene ligeramente incrementada (Figura 8A).

Los resultados obtenidos para la relación de las proteínas en los cultivos con estímulo de leptina, presentan una disminución de un 6% y un 9% respectivamente para los días 1 y 5, mientras que el día 7 muestra un incremento de un 35% con respecto al basal. Estos resultados sugieren que el efecto de leptina sobre la relación RANKL/OPG no es tan importante como para afectar en forma considerable reabsorción ósea en periodos cortos de tiempo. Sin embargo, el resultado obtenido para el día 7 parece indicar que podría existir un efecto sobre la relación de ambas proteínas a largo plazo (Figura 8A).

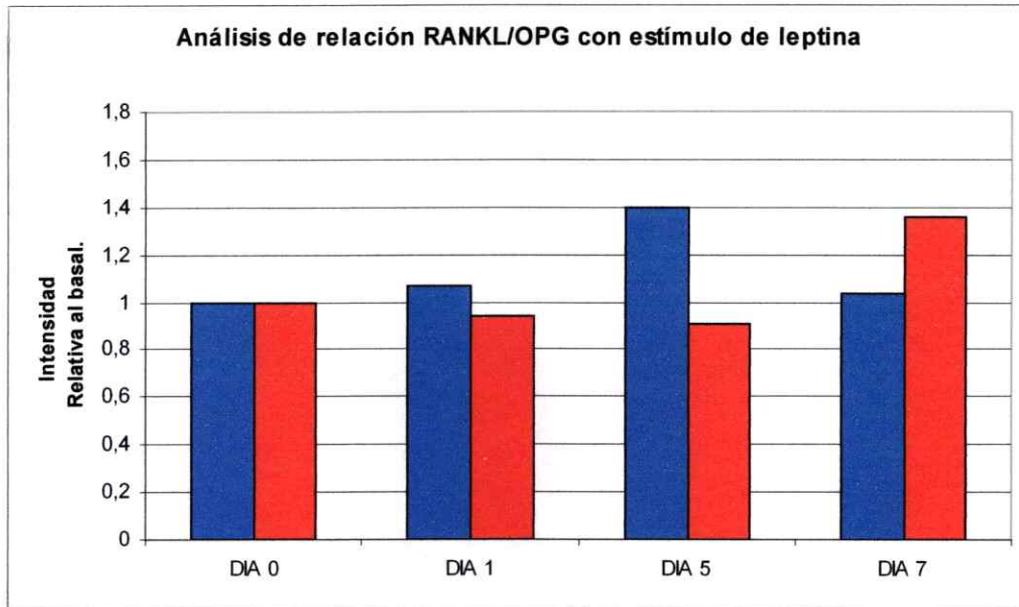


Figura 8A: Relación de Proteínas RANKL y OPG (n=6) en cultivos hMSC en medio de diferenciación osteogénico con y sin estímulo de leptina. La relación de los cultivos control se presenta en azul y la relación de los cultivos estimulados con leptina se presenta en rojo. La relación RANKL/OPG para ambos casos corresponde a la división de los promedios de RANKL con los promedios de OPG correspondientes a los estímulos en observación.

El mismo análisis fue realizado para los cultivos estimulados con androstenediona y leptina y androstenediona en conjunto. El tratamiento con androstenediona sigue la misma tendencia de las muestras control, es decir que la relación tiene un aumento a partir del día 1 y que continua hasta el día 7, con la diferencia de que en este caso el porcentaje de incremento observado corresponde aproximadamente a un 47% para el día 1 y el máximo incremento se da al día 5 con un 57% de alza con respecto al basal, y luego disminuye hasta llegar casi al valor basal (Figura 8B). Por otro lado, el tratamiento con ambas hormonas en conjunto presenta una disminución de un 12% en la razón RANKL/OPG al día 1, un incremento de dicha razón en un 20% al día 5 y una importante baja de la razón que llega a un 61% al día 7.

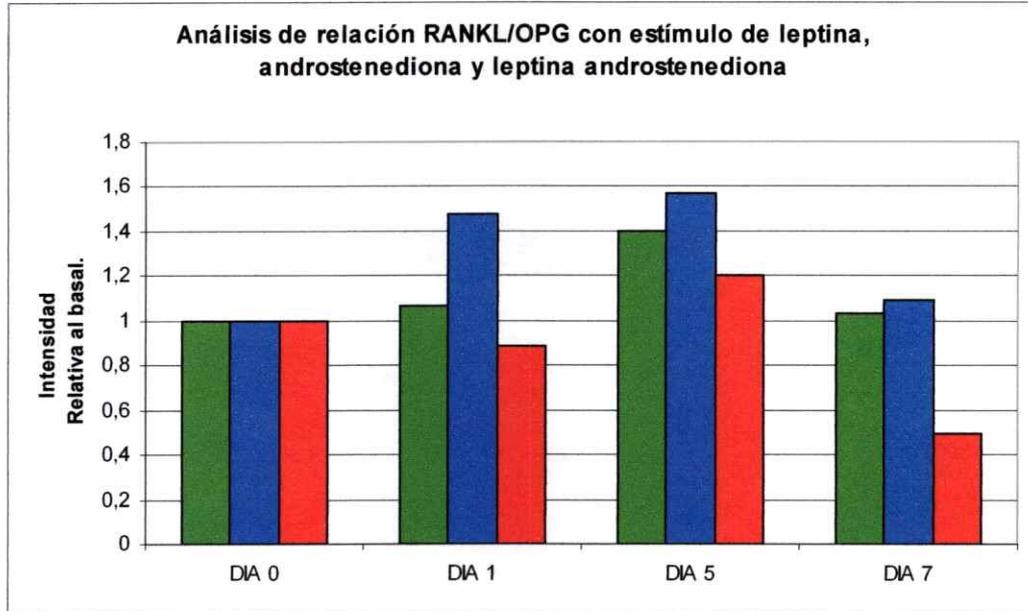


Figura 8B: Relación de Proteínas RANKL y OPG en cultivos hMSC en medio de diferenciación osteogénico con y sin estímulo de androstenediona y leptina androstenediona. La relación de los cultivos control se presenta en verde, la relación de los cultivos estimulados con androstenediona se presenta en azul y la relación de los cultivos estimulados con leptina androstenediona en rojo. La relación RANKL/OPG para ambos casos corresponde a la división de los promedios de RANKL por los promedios de OPG correspondientes a los estímulos en observación.

4. Análisis de la expresión de los transcritos RANKL y OPG en cultivos de MSC mediante RT-PCR.

Para realizar estos experimentos se utilizó la técnica de PCR descrita en Materiales y Métodos. La expresión de los transcritos RANKL y OPG se monitoreó en medio osteogénico suplementado con leptina o androstenediona y leptina, en intervalos de tiempo correspondientes a 0, 1, 5 y 7 días.

4.1 Expresión del transcrito de RANKL

Al comparar los niveles del transcrito de RANKL en los grupos tratados con leptina con respecto al grupo control se observa una disminución de RANKL. Estudios realizados sobre el efecto de leptina en el transcrito RANKL muestran una relación inversa entre la cantidad de leptina y la del ARNm de RANKL (Lamghari y col, 2006). Los resultados obtenidos presentan un incremento en los niveles del transcrito RANKL con respecto a los cultivos control, mostrando en el día 1 un incremento de un 42%, aumentando aun más en el día 5, momento en el cual se produce el máximo nivel de transcrito, sobrepasando en un 100% del nivel basal, luego de esto la síntesis parece decaer al llegar el día 7, pero sin dejar de sobrepasar al nivel basal en un porcentaje cercano al 75%. (Figura 9A).

En los cultivos estimulados con leptina la expresión del transcrito RANKL no parece ser alterada en forma importante, pues el día 1 se mantiene en el nivel basal, mientras que en el día 5 aumenta un 28%, para luego volver a disminuir hasta el nivel basal. Al realizar una comparación entre ambos grupos es sencillo notar que aquellos cultivos suplementados con leptina presentan en general una disminución en el transcrito RANKL en comparación con los cultivos control, lo que concuerda con lo descrito en la literatura (Figura 9A).

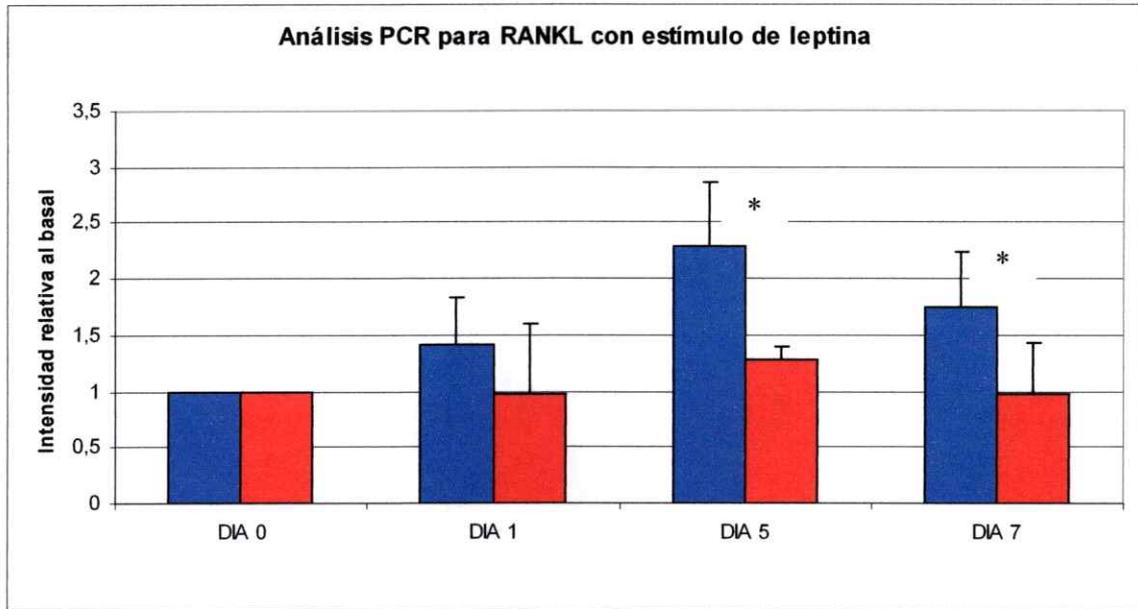


Figura 9A: Comparación de los niveles de transcrito de RANKL en cultivos de hMSC en medio de diferenciación osteogénico con y sin estímulo de leptina (n=2). **Control** (Azul) y **leptina** (Rojo). El Valor Relativo indicado en eje Y, corresponde a la a la razón de las medias con su respectivo valor basal, lo que entrega la cantidad de veces que ha aumentado o disminuido la proteína en estudio. Las diferencias observadas en los días 5 y 7 con respecto a los mismos días de diferenciación en el cultivo control son significativas ($p < 0,05$). Valor media D0=0,13.

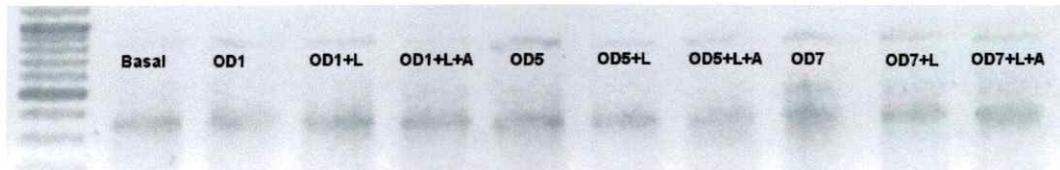


Figura 9A.2: Imagen de un gel de PCR representativo de los experimentos realizados para RANKL, las letras OD, OD+L y OD+L+A indican diferenciación osteogénica, diferenciación osteogénica con estímulo de leptina y diferenciación osteogénica con estímulo de leptina androstenediona respectivamente, el número que las acompaña indica el día de diferenciación de la muestra.

Al analizar el efecto del estímulo conjunto de leptina y androstenediona se aprecia que los niveles del transcrito presentan un aumento de casi un 50% con respecto al basal en el día 1, para luego disminuir en el día 5 aproximadamente un 10%, y presentar una nueva alza de un 50% al llegar el día 7. La comparación de estos

datos con respecto a los obtenidos con los cultivos control muestra que con excepción del día 1, el nivel de transcrito tiende a ser menor en los cultivos que recibieron el estímulo conjunto de leptina y androstenediona (Figura 9B). Este efecto en conjunto resulta interesante considerando que esta disminución en los niveles del transcrito no concuerda con el alza observada en la cantidad de proteína RANKL analizada en puntos anteriores.

Es importante dar a conocer que no fue posible mostrar ningún resultado del efecto individual de androstenediona sobre la síntesis del transcrito RANKL debido a que la cantidad de este transcrito obtenido resultó estar por debajo del rango de detección del método utilizado en esta tesis.

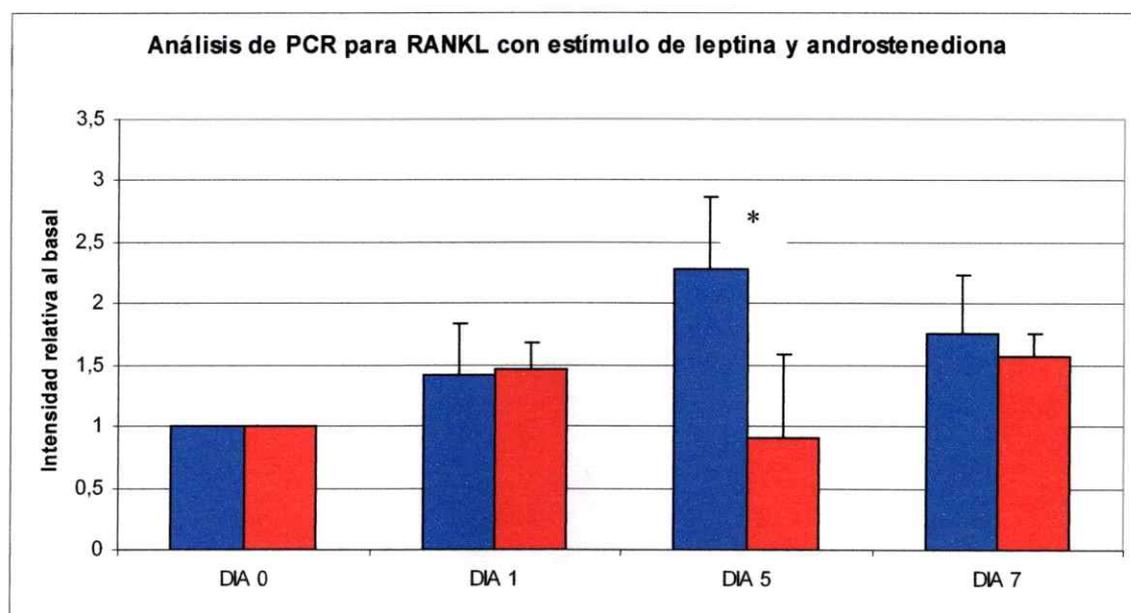


Figura 9B: Comparación de los niveles de transcrito de RANKL en cultivos de hMSC en medio de diferenciación osteogénico con y sin estímulo de leptina y androstenediona (n=2). **Control** (Azul) y **leptina y androstenediona** (Rojo). El Valor Relativo indicado en eje Y, corresponde a la a la razón de las medias con su respectivo valor basal, lo que entrega la cantidad de veces que ha aumentado o disminuido la proteína en estudio. La diferencia observada en el día 5 con respecto al mismo día de diferenciación en el cultivo control es significativa ($p < 0,05$). Valor Media D0=0,13.

4.2 Expresión del transcrito de OPG

En este experimento, la expresión del transcrito OPG fue analizada en cultivos controles y tratados con leptina y leptina y androstenediona en conjunto, en las mismas condiciones y tiempos que los experimentos anteriores.

En las muestras control, los resultados indican un aumento de OPG de un 15% en el día 1, llegando a un máximo de incremento de 54% en el día 5, que luego disminuye en el día 7 hasta alcanzar un 32% de aumento con respecto al basal. Las muestras cultivadas con leptina por su parte, no muestran ningún cambio importante durante los días 1 y 5, manteniéndose en un nivel muy similar al basal. El día 7 por su parte exhibe un aumento cercano al 60% con respecto al basal (Figura 10 A).

Los datos de los cultivos estimulados con leptina parecen indicar que el incremento de OPG debido a leptina requiere de un tiempo experimental mayor a los 7 días para poder ser apreciado claramente, como se describe en los estudios realizados con anterioridad.

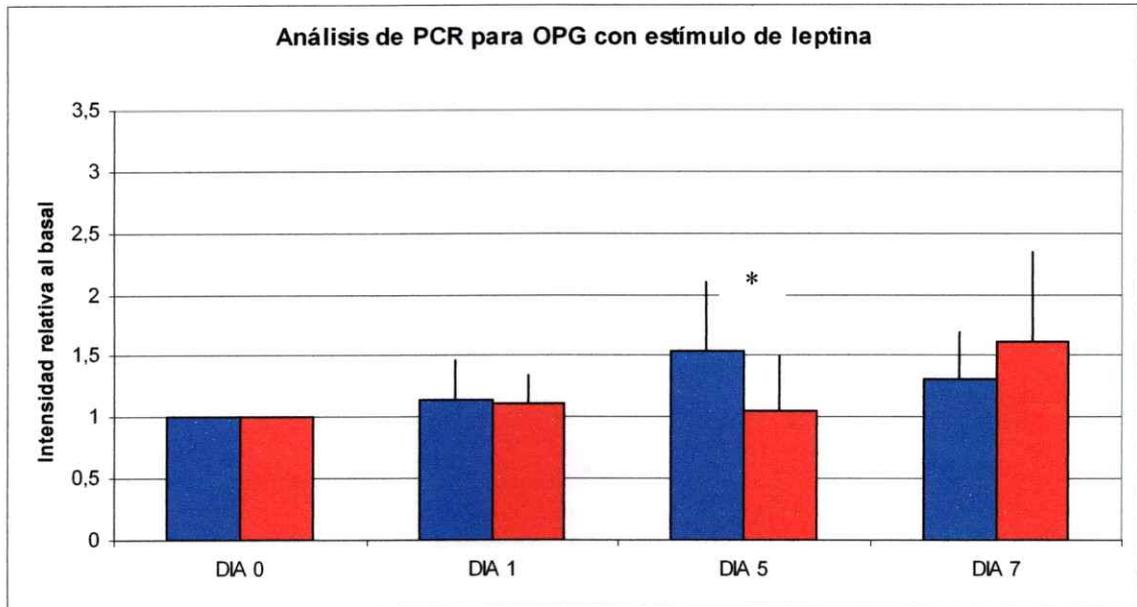


Figura 10 A: Comparación de los niveles de transcrito de OPG en cultivos de hMSC en medio de diferenciación osteogénico con y sin estímulo de leptina (n=5). **Control** (Azul) y **leptina** (Rojo). El Valor Relativo indicado en eje Y, corresponde a la a la razón de las medias con su respectivo valor basal, lo que entrega la cantidad de veces que ha aumentado o disminuido la proteína en estudio. La diferencia observada en el día 5 con respecto al mismo día de diferenciación en el cultivo control es significativa ($p < 0,05$). Valor media D0= 0,892.

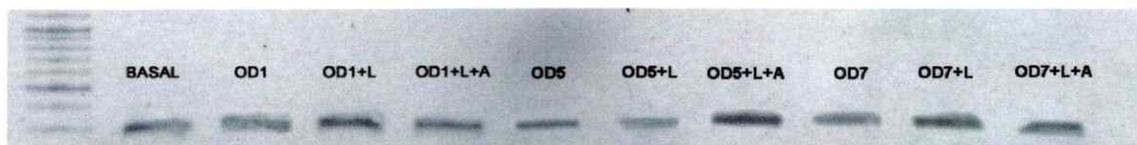


Figura 10A.2: Imagen de un gel de PCR representativo de los experimentos realizados para OPG, las letras OD, OD+L y OD+L+A indican diferenciación osteogénica, diferenciación osteogénica con estímulo de leptina y diferenciación osteogénica con estímulo de leptina androstenediona respectivamente, el número que las acompaña indica el día de diferenciación de la muestra.

La síntesis del transcrito OPG en los cultivos suplementados con androstenediona sigue el mismo comportamiento que el de los cultivos control. De esta forma se observa que el día 1, presenta un nivel de transcrito que se mantiene muy cerca del nivel basal, mientras que al día 5 se produce un alza de aproximadamente un

61% con respecto al basal y vuelve a disminuir en el día 7 sobrepasando el nivel basal solo por un 34%. Sin embargo, el estímulo en conjunto de leptina y androstenediona genera un alza constante y muy importante del transcrito OPG a lo largo del proceso de diferenciación, observándose un incremento de casi un 20% en el día 1, llegando a duplicarse el valor basal en el día 5, pero el mayor incremento se aprecia al día 7 donde se sobrepasa 2 veces el valor inicial (Figura 10 B). Esto muestra que el estímulo en conjunto de las hormonas leptina y estrógeno es considerablemente más fuerte que sus efectos por separado, lo que podría deberse a una potenciación mutua o simplemente a la suma de sus efectos individuales.

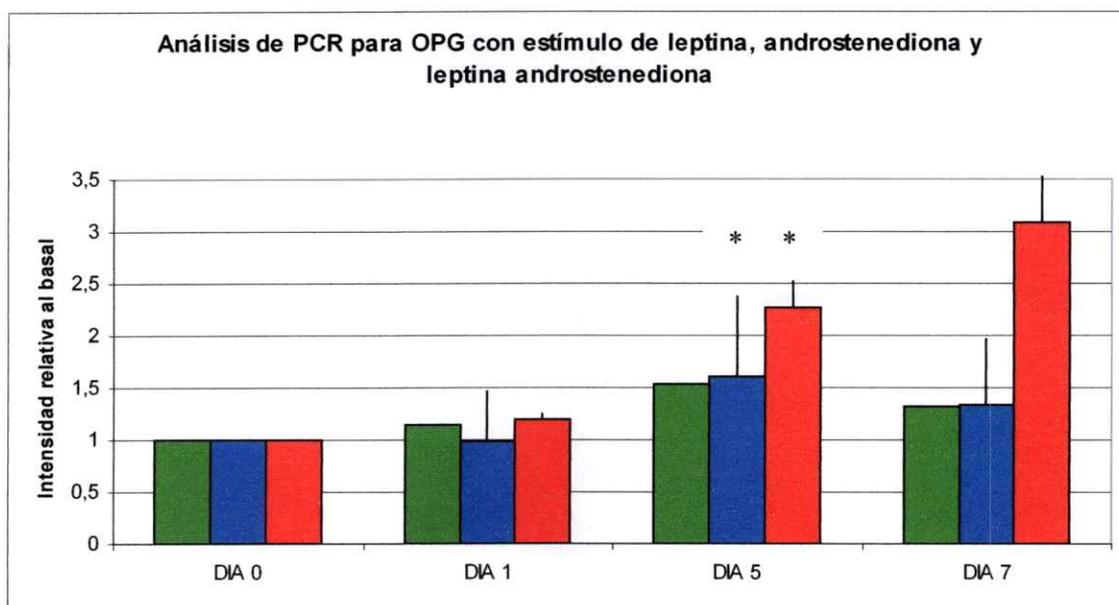


Figura 10 B: Comparación de los niveles de transcrito de OPG en cultivos de hMSC en medio de diferenciación osteogénico con y sin estímulo de androstenediona y leptina androstenediona (n=5). **Control** (verde), **androstenediona** (Azul) y **leptina y androstenediona** (Rojo). El Valor Relativo indicado en eje Y, corresponde a la a la razón de las medias con su respectivo valor basal, lo que entrega la cantidad de veces que ha aumentado o disminuido la proteína en estudio. El cambio observado en los días 5 y 7 son significativos respecto a los basales correspondientes a cada estímulo ($p < 0,05$). Valor Media D0=0,892.

La relación de los transcritos RANKL/OPG fue analizada para observar si existía algún cambio que indicara una posible alteración importante del equilibrio en la síntesis de los ARNm de las proteínas en estudio. Al graficarse la relación RANKL/OPG obtenida a partir de los datos de las muestras control y de las muestras con estímulo de leptina, se observa que hay un incremento paulatino de la relación en las muestras control que va desde un incremento de 24% en el día 1, llegando un incremento máximo de un 49% en el día 5, para luego mostrar de 33% en el día 7 con respecto al basal. Por otro lado, en las muestras tratadas con leptina, la relación RANKL/OPG disminuye con respecto al basal cerca de un 13% en el día 1, para luego incrementarse un 22%, y finalmente disminuir un 40% en el día 7 (Figura 11 A).

Es importante notar que la relación de las proteínas bajo el estímulo de leptina siempre se mantiene baja en comparación a los días respectivos en el control, sobre todo en el día 7 de diferenciación donde existe una importante disminución de casi un 50% de la relación. Estos resultados sugieren leptina podría ejercer algún efecto a nivel transcripcional de las moléculas involucradas en el sistema RANK/RANKL/OPG.

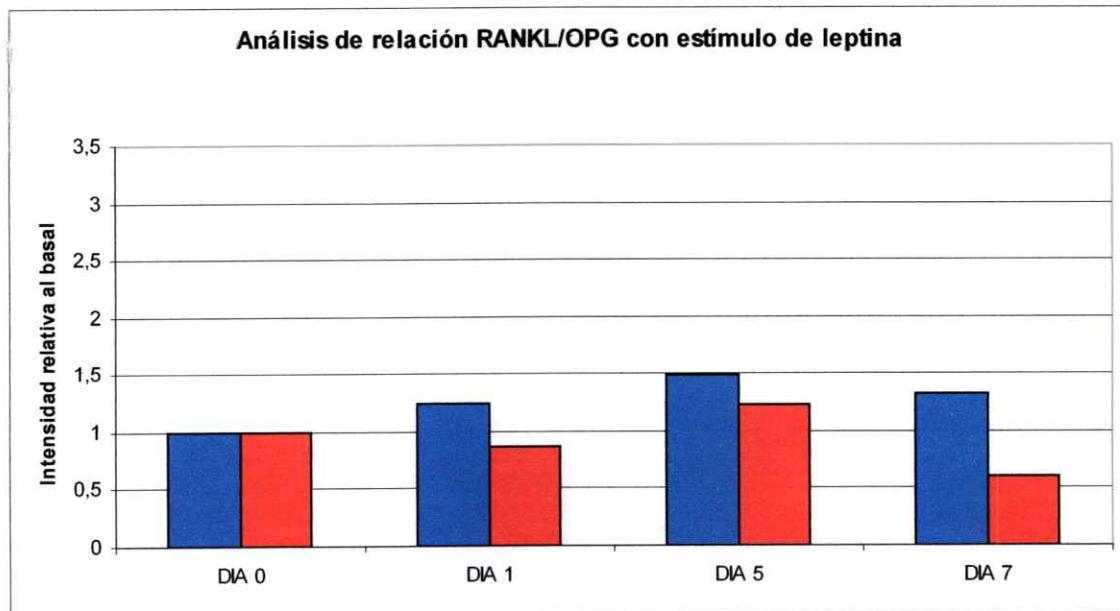


Figura 11 A: Relación de transcritos de RANKL y OPG en cultivos hMSC en medio de diferenciación osteogénico con y sin estímulo de leptina. La relación de los cultivos **control** se presenta en **azul** y la relación de los cultivos estimulados con **leptina** en **rojo**. La relación RANKL/OPG para ambos casos corresponde a la división de los promedios de RANKL por los promedios de OPG correspondientes a los estímulos en observación.

La figura 11 B muestra la relación RANKL/OPG de los cultivos control versus los cultivos suplementados con androstenediona+leptina. En este gráfico se observa que la relación en los cultivos suplementados con androstenediona y leptina tienden a disminuir en forma crítica en los dos últimos días de diferenciación, aproximadamente en un 50% en ambos casos. Esta disminución se debe probablemente al estímulo conjunto de las dos hormonas, lo que deriva en el incremento del ARNm de OPG con respecto al ARNm de RANKL.

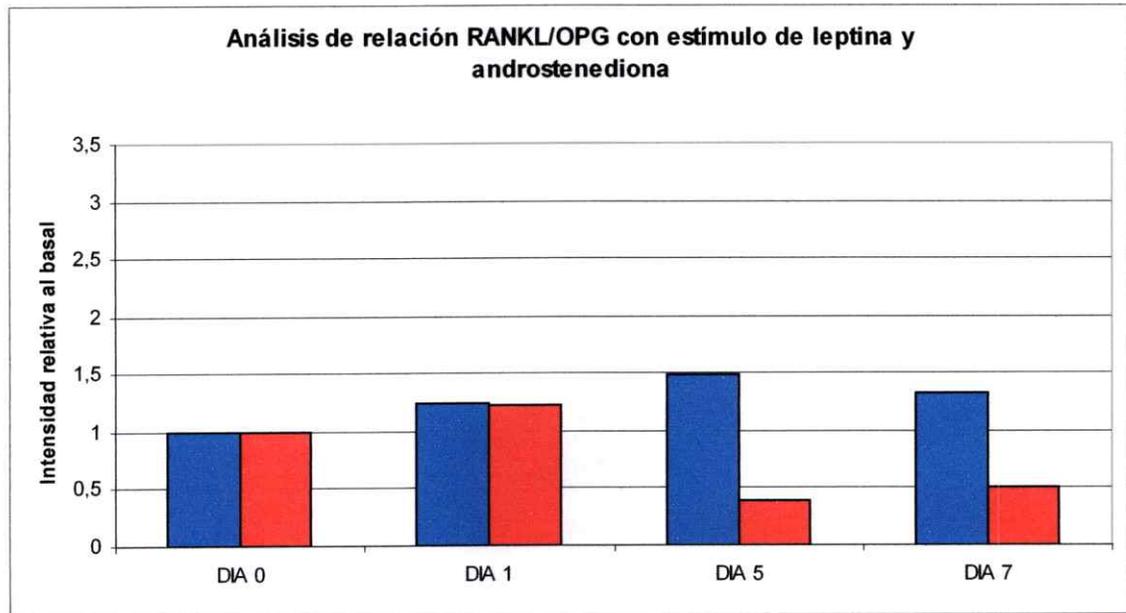


Figura 11 B: Relación de transcritos de RANKL y OPG en cultivos hMSC en medio de diferenciación osteogénico con y sin estímulo de androstenediona. La relación de los cultivos **control** se presenta en **azul** y la relación de los cultivos estimulados con **leptina y androstenediona** se presenta en **rojo**. La relación RANKL/OPG para ambos casos corresponde a la división de los promedios de RANKL por los promedios de OPG correspondientes a los estímulos en observación.

VI DISCUSIÓN

La masa ósea es un tejido que se encuentra en constante recambio, y que llega a su máximo desarrollo aproximadamente en la tercera década de vida, lo que implica que de ahí en adelante se inicia el proceso de pérdida de hueso en forma paulatina, pero no acelerada. Este proceso es mucho más notorio en personas de sexo femenino y son estas las mayormente afectadas por enfermedades de pérdida de masa ósea como es el caso de la osteoporosis.

Dado que el equilibrio del proceso de mantención del hueso es delicado, cualquier alteración en alguno de sus componentes genera un efecto en cascada que afecta la remodelación del tejido, alterando la microarquitectura ósea. Es claro entonces que el mecanismo de mantención del hueso es muy complejo, pero gracias a diversos estudios realizados, ya se conocen moléculas que serían cruciales en el funcionamiento del proceso, como por ejemplo el sistema RANK/RANKL/OPG.

El sistema RANK/RANKL/OPG ha demostrado ser crucial para los osteoclastos, y numerosos estudios sugieren que las alteraciones de este sistema son las responsables de los desórdenes metabólicos óseos que derivan en enfermedades óseas degenerativas. RANKL es necesario y suficiente para la diferenciación osteoclástica (Fuller y col, 1998.), además aumenta la actividad y el tiempo de vida de los osteoclastos al disminuir su apoptosis. RANKL es expresado en la superficie de las células mesenquimáticas de linaje osteoblástico y el contacto célula-célula permite a esta molécula unirse a su receptor específico RANK, el cual se encuentra en la

superficie de las células del linaje osteoclástico. El otro miembro de este sistema, OPG, es producido por células mesenquimáticas y por osteoblastos, actúa como un receptor soluble de RANKL, lo que disminuye la concentración efectiva de RANKL en el medio, inhibiendo la diferenciación y activación osteoclástica (Eghbali-Fatourehchi, 2003).

Enfermedades óseas, como la osteoporosis, parecen tener una menor incidencia en la población con obesidad, por lo que se pensó que algún factor bioquímico asociado al tejido adiposo podría ser responsable de este efecto. Recientemente se ha observado que receptores para leptina se encuentran distribuidos en varios tejidos, entre los que se encuentra el tejido óseo, sugiriendo que podría ser el factor que relaciona la obesidad con la menor incidencia de osteoporosis (Holloway, 2002). Esta hormona, está involucrada en la diferenciación osteoblástica, aumentando la síntesis de OPG, y disminuyendo la producción de RANKL (Burgera et al, 2001).

También es importante mencionar que la incidencia de la osteoporosis se encuentra incrementada en la población femenina luego de la menopausia, debido al fin de la producción de estrógenos por los ovarios. El estrógeno favorece la formación ósea, mediante la inhibición de la osteoclastogénesis, por el bloqueo de la síntesis de citoquinas como IL-1 y TNF, los que favorecen la producción de RANKL en las células estromáticas (Uemalsu y col, 1996). Además el estrógeno aumenta la producción de OPG en las células osteoblásticas (Saika y col, 2001; Linberg y col, 2001). Por otra parte, el estrógeno disminuye la respuesta de los precursores osteoclasticos a la presencia de RANKL. (Ralston y col, 1990)

Debido a los antecedentes ya descritos en esta tesis se decidió estudiar el efecto de leptina y estrógeno sobre las hMSC obtenidas de muestras de médula ósea de

donantes postmenopáusicas, durante la diferenciación osteogénica y así determinar si estas hormonas tienen un rol protector frente a la pérdida de masa ósea. Para estudiar el efecto de los estrógenos se usó el precursor androstenediona, como estímulo en los cultivos. La selección de este precursor se debió a los resultados encontrados en el laboratorio del Doctor Juan Pablo Rodríguez en el año 2006 (Rodríguez y col, 2006), los que indican la existencia de la enzima aromatasa en hMSC en cultivos la cual es capaz de transformar al precursor androstenediona en estrógeno. Es importante hacer nota que los resultados obtenidos en este trabajo dependen por tanto, de la actividad in situ de esta enzima. Otro punto que es muy importante resaltar es el hecho de que en la actualidad no existen estudios que utilicen el estímulo en conjunto de leptina y androstenediona en este tipo de células humanas.

Los resultados obtenidos en esta tesis, a partir de cultivos de células mesenquimáticas humanas (hMSC), muestran que los cultivos control en general tienen un incremento en los niveles de RANKL, tanto en los experimentos de Western Blot como en los de PCR, y en ambos casos el incremento parece ser más notorio en el día 5. Al agregar leptina como estímulo se observa que los niveles de RANKL se mantienen bajo los niveles de los cultivos control. Este efecto de leptina sobre la expresión de RANKL ya había sido descrito por Lamghari en el año 2006 en la línea celular MC3T3-E1, una línea celular osteoblástica de ratón (Lamghari y col, 2006). Sin embargo, el efecto inhibitorio de leptina también parece también afectar el nivel de la proteína OPG lo que se contradice con estudios realizados por Burgera y col, en el año 2001 en ratas ovariectomizadas, que indican que la administración de leptina debería inducir un aumento en los niveles de la proteína OPG. Esta divergencia en los

resultados puede deberse a que en aquel estudio se trabajó en un organismo completo y en la presente tesis se utilizaron cultivos celulares. Además podemos agregar la diferencia en la concentración efectiva de la leptina aplicada en los ensayos, en el caso de las ratas se les administró 100mg de leptina por día y en este experimento se aplicó 1mg/mL (10 mL por placa) cambiando el medio 2 veces por semana.

La relación RANKL/OPG sugiere que las variaciones en el sistema no son importantes hasta el día 7, cuando se produce un aumento en este indicador, principalmente debido a una disminución en OPG y un ligero incremento en RANKL. Lo anterior es indicio de un posible incremento en la actividad osteoclástica en el cultivo, lo que en un organismo se traduciría en un aumento en la reabsorción ósea. Este posible incremento también se produce en los cultivos controles, sin embargo se observa en día 5.

El rol protector de leptina sobre la reabsorción ósea es discutido hasta hoy. Estos datos parecen indicar que este rol no estaría dado por la baja o incremento de una de las dos proteínas en estudio, sino de una depresión del sistema completo.

Los resultados obtenidos a partir de los cultivos suplementados con androstenediona no evidencian ninguna alteración importante en los niveles de la proteína RANKL en los días 1 y 5, los que se mantienen en torno al valor basal; sin embargo, esta situación se revierte al día 7 donde se produce un marcado incremento. Cabe mencionar que fue imposible cuantificar el experimento de PCR para observar el efecto de androstenediona sobre la síntesis del transcrito RANKL debido probablemente a la existencia de algún problema metodológico como por ejemplo poco rendimiento de RNA extraído de las muestras utilizadas, degradación del RNA antes o

durante el proceso de extracción, ineficiencia en el paso de la transcripción reversa o poca cantidad e inestabilidad del cDNA obtenido.

. La baja cantidad del transcrito OPG obtenido en este experimento puede deberse al efecto de los estrógenos producidos in situ, pero para poder comprobar esta hipótesis sería necesario analizar un mayor número de muestras.

Por otro lado, los resultados del efecto de androstenediona sobre la proteína OPG presentan una marcada disminución del nivel de esta proteína la que llega a bordear el 40% en los días 1 y 5, mientras que en el día 7 se produce un incremento importante de casi un 50% con respecto al basal. Con respecto al nivel de transcrito para esta proteína, los resultados muestran que el nivel observado al día 1 se mantiene muy cercano al nivel basal, mientras que los días 5 y 7 incrementan la síntesis del transcrito sobre un 30%. Este resultado concuerda con lo expuesto por Holloway en el año 2002, el cual demostró que células mononucleadas humanas tratadas con la hormona leptina tienen un incremento en el ARNm de OPG, lo que deriva en una inhibición de la osteoclastogénesis (Holloway, 2002). Es posible sugerir que el alza de OPG y RANKL observada en el día 7 en los experimentos individuales para estas proteínas, puede deberse a que el efecto de los estrógenos esté relacionado directamente con una determinada concentración efectiva en el medio, por este motivo el efecto requiere de más tiempo para poder ser observado.

Los niveles de ARNm para RANKL y OPG en las condiciones experimentales utilizadas en esta tesis durante la diferenciación osteogénica, coinciden de mejor manera con los resultados de la literatura que aquellos obtenidos con los niveles de las proteínas (Holloway y col, 2002; Lamghari y col, 2006). El bajo nivel de proteínas

detectado puede explicarse por un problema de estabilidad de las moléculas ya traducidas, o estar relacionado con alguna alteración en la modificación post-transcripcional. Otro punto importante que pudo alterar los niveles medidos a nivel proteico puede ser que el método de detección utilizado no haya tenido la potencia requerida para detectar en forma más eficaz las moléculas en estudio.

Sin embargo, en el análisis de la relación de las proteínas RANKL/OPG de estos cultivos se evidencia un efecto contrario al esperado pues ocurre un incremento generalizado que sobrepasa la basal y a los cultivos control. Con la información obtenida en estas pruebas es posible sugerir que la cantidad de estrógenos producida a partir de androstenediona no tendría un efecto protector sobre la reabsorción ósea, debido a que el incremento observado en la relación se debe a una disminución en la síntesis de OPG con respecto a RANKL.

Debido a la falta de resultados en PCR para este estímulo, no fue posible realizar el cálculo de la relación entre los transcritos de RANKL y OPG, por lo que esta interpretación debe ser considerada como un resultado preliminar y que requiere de la realización de una mayor cantidad de experimentos.

El efecto del estímulo conjunto de androstenediona y leptina muestra que el nivel de la proteína RANKL prácticamente no varía con respecto al nivel basal en los días 1 y 5, pero disminuye aproximadamente un 20% en el día 7. Sin embargo, el nivel del transcrito RANKL sufre un incremento considerable de alrededor del 50% en los días 1 y 7. Por su parte, la proteína OPG sufre una pequeña variación en los días 1 y 5, pero presenta un gran incremento de un 67% al día 7. El transcrito OPG muestra un aumento constante el cual llega a su punto máximo en el día 7, llegando a sobrepasar

el basal en más de un 200%

Finalmente la relación entre las proteínas RANKL Y OPG indica variaciones de aproximadamente un 20% en los días 1 y 5 con respecto al basal, pero al llegar el día 7 sufre una disminución de un 50%. En cambio, la relación de los niveles de transcrito muestra una disminución de un 60% al día 5 y de un 50% al día 7.

En estos resultados es necesario volcar la atención hacia en la disminución de la razón observada en el día 7, ya que parece deberse al gran incremento de OPG tanto a nivel proteico como a nivel de ARNm. Este incremento nuevamente concuerda con lo descrito por Holloway (2002) sobre el efecto de leptina que incrementa la síntesis del transcrito OPG, pero en este caso hay que sumar además el efecto de esta hormona en el incremento de la actividad de la enzima aromatasa lo que podría estar generando un aumento en la síntesis de estrógeno in situ, sugiriendo que existe un efecto potenciado de ambas hormonas. Lo anterior podría también estar indicando que los diferentes resultados obtenidos con leptina pueden deberse a diferentes niveles basales de estrógenos. Este punto no ha sido analizado en los estudios realizados hasta hoy sobre la acción de estas hormonas, ya que los resultados entregados por estas investigaciones son obtenidos a partir de ratones sin gónadas y tratados con leptina, sin tomar en cuenta la producción extra gonadal de estrógenos o precursores de estrógenos que pudiera existir.

De esta forma, la información recopilada en este estudio estaría indicando que ni el precursor de estrógenos ni la leptina tienen un efecto muy significativo, en la reabsorción ósea en forma individual. Sin embargo, al encontrarse ambas hormonas como estímulo la relación entre RANKL y OPG disminuye notoriamente, lo que podría

ser indicio de que ambas hormonas son necesarias para la inhibición de la activación de la reabsorción ósea en MSCs, y de que existe una potenciación del efecto de ambas hormonas.

Los resultados que indican que existe una disminución de la relación RANKL/OPG como respuesta a un efecto conjunto de las hormonas leptina y estrógeno, podría sugerir que estaría ocurriendo una inhibición a nivel de la activación osteoclástica. De no ocurrir los hechos antes mencionados, existe la probabilidad de que ocurra una activación de las células osteoclásticas, pero dicha activación debería ser revertida por incremento observado en los niveles de OPG con respecto a RANKL. En ambos casos el efecto favorecido es la síntesis de hueso nuevo, lo que permite sugerir que estas dos hormonas controlan en conjunto una parte importante del proceso de remodelación ósea.

Debido a lo ya expuesto, la hipótesis de que leptina ejercería un efecto protector sobre la pérdida de masa ósea parece correcta, sobre todo considerando el efecto de esta hormona sobre la activación de la enzima aromatasa y su consiguiente efecto en la síntesis de estrógeno. Por su parte los resultados obtenidos para estrógenos parecen corroborar la importancia de estas hormonas sexuales en la regulación de la remodelación ósea. Por lo tanto es posible sugerir que ambas hormonas son cruciales para evitar la diferenciación o activación de los osteoclastos.

A pesar del carácter preliminar de alguno de los resultados entregados por este estudio, estos dan pie para efectuar estudios más profundos al respecto, y dejan abierta la posibilidad a nuevos enfoques que permitirán una mejor comprensión de los componentes relacionados con los desórdenes en la remodelación ósea, favoreciendo

la creación de tratamientos más completos y complejos destinados a desordenes óseos como la osteoporosis, que permitirán una mejor calidad de vida a las personas que puedan padecer este tipo de alteraciones óseas.

VII CONCLUSIONES

1. Leptina en los cultivos de hMSC de donantes posmenopáusicas ejerce su efecto mediante la disminución del nivel de RANKL en relación a OPG, incrementando la relación RANKL/OPG.

2. La síntesis de estrógenos in situ, incrementa el nivel de OPG en relación a RANKL, disminuyendo la relación RANKL/OPG.

3. El efecto de leptina y estrógeno sobre la relación RANKL/OPG favorece el proceso de formación ósea sobre el de reabsorción ósea.

4. El uso de leptina y androstenediona como estímulo en los cultivos de hMSC parece mostrar un efecto potenciado de ambas hormonas, sobre todo a tiempos largos de exposición al estímulo.

5. Los factores estudiados pueden ser de mucha utilidad en futuras terapias contra la osteoporosis y otras enfermedades óseas, lo que podría contribuir a una baja de los costos de tratamiento para estas enfermedades y en una mejor calidad de vida para los pacientes.

VIII BIBLIOGRAFÍA

1. Anderson MA, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L (1997) A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 390:175–179.
2. Boyce, Brendan F and Xing, Lianping. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin *Arthritis Research & Therapy* 2007, 9(Suppl 1):S1 (doi:10.1186/ar2165).
3. Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C et al. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol* 1999; 145 (3): 527-38.
4. Burguera, B., L.C. Hofbauer, T. Thomas, F. Gori, G.L. Evans, S. Khosla, B.L. Riggs and R.T. Turner. Leptin reduces ovariectomy-induced bone loss in rats. *Endocrinology*, 2001;142: 3546-53.
5. Canalis E, Centrella M, Burch W, and McCarthy TL. Insulin-like growth factor I mediates selective anabolic effects of parathyroid hormone in bone cultures. *J Clin Invest.* 1989 January; 83(1): 60–65.
6. Chapuy MC, Arlot ME, Duboeuf F. Vitamin D3 and calcium to prevent hip fracture in the elderly women. *N Engl J. Med*, 1991; 327:1637
7. Chenu C, valentine-Opran A, Chavassieux P, Saéz s, Menunier PJ, delmas PD. Insulin-like growth factor I hormonal regulation by growth hormone and by 1,25(OH)2D3 and activity on human osteoblast-like cells in short-term cultures. *Bone*, 1990; 11:81-6.
8. Cirmanová V, Bayer M, Stárka L, Zajícková K. The effect of leptin on bone: an evolving concep of action. *Physiol Res.* 2008;57 Suppl 1:S143-51.
9. Comish J, Callon KE, Bava U, Lin C, Naot D, Hill BL, Grey AB, Broom N, Myers DE, Nicholson GC, Reid IR. Leptin directly regulates bone cell function in vitro and reduces bone fragility in vivo. *J Endocrinol.* 2002 Nov;175(2):405-15.
10. Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *J Clin*

Invest 2006; 116:561-70.

11. DUCY P, AMLING M, TAKEDA S, PRIEMEL M. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell* 2000 Jan 21;100(2):197-207.
12. DUCY P, SCHINKE T, KARSENTY G. The osteoblast a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science*, 2000; 289:1501-1504.
13. EGHBALI-FATOURECHI G, KHOSLA S, SANYAL A, BOYLE WJ, LACEY DL, RIGGS BL. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *J Clin Invest*, 2003 Apr; 111(8):1221-30.
14. ELEFTERIOU F, AHN JD, TAKEDA S, STARBUCK M, YANG X, LIU X, KONDO H, RICHARDS WG, BANNON TW, NODA M, CLEMENT K, VAISSE C, KARSENTY G. Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature*, 2005 Mar 24;434(7032):514-20
15. FRIEDMAN J, HALAAS J. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998; 395: 763-769.
16. FULLER K, WONG B, FOX S, CHOI Y, CHAMBERS T J. TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J Exp Med* 1998; 188: 997-1001.
17. HADJI P, HARS O, BOCK K, STURM G, BAUER T, EMONS G et al. The influence of menopause and body mass index on serum leptin concentrations. *Eur J Endocrinol* 2000; 143:55-60.
18. HARADA S, RODAN GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*. 2003 May 15;423(6937):349-55.
19. HAMRICK MW, DELLA-FERA MA, CHOI YH, PENNINGTON C, HARTZELL D, BAILE CA. Leptin treatment induces loss of bone marrow adipocytes and increases bone formation in leptin-deficient ob/ob mice. *J Bone Miner Res*. 2005 Jun;20(6):994-1001.
20. HESS R, PINO AM, RÍOS S, FERNÁNDEZ M, RODRÍGUEZ JP. High affinity leptin receptors are present in human mesenchymal stem cells(MSCs) derived from control and osteoporotic donors. *J Cell Biochem*. 2005 Jan 1;94(1):50-7.

21. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* 1999;140:4367-70.
22. Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med*,2001 Jun;79(5-6):243-53.
23. Holloway WR, Collier FM, Aitken CJ, Myers DE, Hodge JM, Malakellis M, Gough TJ, Collier GR, Nicholson GC. Leptin inhibits osteoclast generation. *J Bone Miner Res*, 2002 feb; 17 (2):200-9.
24. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem*, 1997;64:295-312.
25. Komm BS, Terpening CM, Benz DJ. Estrogen binding, receptor ARNm, and biologic response in osteoblast-like osteosarcoma cells. *Science*.1988 Jul 1: 241 (4861):81-4.
26. Kostenuik PJ. Osteoprotegerin and RANKL regulate bone resorption, density, geometry and strength. *Curr Opin Pharmacol*. 2005 Dec;5(6):618-25.
27. Lamghari M , Tavares L., Camboa N, Barbosa M.A.. Leptin effect on RANKL and OPG expression in MC3T3-E1 osteoblasts. *Journal of Cellular Biochemistry*.2006 Feb. 98 (5):1123 – 1129.
28. Lerner U.H. Bone Remodeling in Post-menopausal Osteoporosis. *J Dent Res* 85(7):584-595, 2006
29. Li J, Sarosi I, Yan XQ, Morony S, Capparelli C, Tan HL et al. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97 (4): 1566-71.
30. McCormick R. K. Osteoporosis: Integrating biomarkers and other diagnostic correlates into the management of bone fragility. *Altern Med Rev* 2007.12 (2): 113-145.

31. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: Basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 2000; 21: 115-37.
32. Mizuno A, Amizuka N, Irie K Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin, *Biochem Biophys Res Com* 1998; 247: 610-15.
33. Nacional institute of health. Consensus development conference statement osteoporosis prevention diagnosis and therapy. Bethesda, Md, Nacional institute of health; 2000:1-29.
34. Pino AM, Rodríguez JP, Rodríguez JM. Aromatase activity of human mesenchymal stem cell is stimulated by early differentiation vitamin d and leptin. *J Endocrinol* 2006; 191(3):715-725.
35. Raisz LG. The osteoporosis revolution. *Ann Int Med*, 1997; 126:458-462.
36. Raisz LG. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin Chem*, 1999; 45:1353-8.
37. Ralston SH, Russell RGG, Gowen M. Estrogen inhibits release of tumor necrosis factor from peripheral blood mononuclear cells in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 1990, 5: 983-988.
38. Reseland JE, Syversen U, Bakke I, Qvigstad G, Eide LG, Hjertner O, Gordeladze JO & Drevon CA. Leptin is expressed in and secreted from primary cultures of human osteoblasts and promotes bone mineralization. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2001;16 :1426-1433.
39. Rodríguez JP, Garat S, Gajardo H, Pino AM, Seitz G. Abnormal osteogenesis in osteoporotic patients is reflected by altered mesenchymal stem cells dynamics. *J Cell Biochem*, 1999; 75:414-423.
40. Romas E, Gillespie MT, Martin TJ. Involvement of receptor activator of NF kB ligand and tumor necrosis factor alpha in bone destruction in rheumatoid arthritis. *Bone* 2002; 30:340-6.
41. Ross FR, RANKing the importance of measles virus in Paget's disease. *J Clin Invest*, 2000; 105:555-558.

42. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89 (2): 309-19.
43. Stafford L, Bleasel J, Giles A, Handelsman D. Androgen deficiency and bone mineral density in men with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2000 Dec;27(12):2786-90
44. Suda T, Takahashi N, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr Rev*, 1992; 13:66-80.
45. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 1999; 20: 345-57.
46. Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, Chiba T, Murata S, Sato K, Takaoka A, Yokochi T, Oda H, Tanaka K, Nakamura K, Taniguchi T. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature*. 2000 Nov 30;408(6812):600-5.
47. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 1995; 83:1263-1271.
48. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclast. *Science*, 2000;289:1504-1508.
49. Thomas T, Gori F, Khosla S, Jensen MD, Burguera B & Riggs BL. Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinology*, 1999;140: 1630-1638.
50. Thomas T, Gori F, Khosla S, Jensen MD, Burguera B, Riggs BL. Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinology*. 1999 Apr;140(4):1630-8.
51. Tomkinson A, Gevers EF, Wit JM, Reeve J, Noble BS. The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis. *J Bone Miner Res*. 1998 Aug;13(8):1243-50.

52. Uemalsu S., Mogi M. Interleukin (IL)-1Beta, IL-6, Tumor Necrosis Factor- α , Epidermal Growth Factor, and B2-Microglobulin Levels Are Elevated in Gingival Crevicular Fluid during Human Orthodontic Tooth Movement. *J. Dent. Res.* 75 (1): 562-7, January, 1996.
53. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM . *RANKL-RANKL signaling in osteoclastogenesis and bone disease. Trends Mol Med* 2006, 12:17-25.
54. Wittrant, Y. et al. (2004) RANKL/RANK/OPG: new therapeutic targets in bone tumours and associated osteolysis. *Biochim. Biophys. Acta* 1704, 49–57.
55. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin /osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/ RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95 (7): 3597-602.

ANEXO

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Rol protector de la leptina en la osteoporosis: efecto directo sobre células progenitoras mesenquimáticas humanas (MSCs)

Resumen del proyecto: En este estudio se quiere analizar el efecto de una hormona, la leptina, sobre la actividad de células humanas que pueden originar hueso. El estudio no se realiza directamente en las personas, sino en células que se obtienen durante la cirugía requerida por fractura de cadera. En las células, que se pueden mantener en cultivo, se analiza el efecto de la hormona en la producción de agentes protectores de la producción de hueso (estrógenos, OPG y RANKL).

CONSENTIMIENTO INFORMADO

1. Información sobre el estudio de investigación.

¿Cuál es el propósito del estudio?

Conocer si la leptina, que es una hormona, tiene una acción directa en un tipo de células que se encuentra en la médula del hueso y que pueden formar nuevo hueso.

¿Quién puede participar en este estudio?

Mujeres mayores de 65 años, que por indicación del médico tratante requieren cirugía de cadera.

¿Por qué debo considerar mi participación como sujeto de investigación en este estudio?

Porque obtener células de tejidos humanos de personas sanas, para estudios experimentales, es muy difícil y sólo es posible en intervenciones quirúrgicas obligadas. Al participar en el estudio Ud. colabora para la obtención de la muestra de tejido, desde el cual se obtendrán las células.

¿Tengo necesariamente que participar en este estudio? ¿Si acepto participar, puedo cambiar de opinión o retirarme?

Su participación es voluntaria, sólo si conciente se guardará la muestra tejido óseo.

¿Si decido participar en el estudio, en qué consisten precisamente las evaluaciones, y qué tipo de tratamiento, o procedimientos me van a practicar?

Antes de la cirugía a la que usted será sometida como parte de su tratamiento se le solicitará una muestra de orina y se tomará una muestra de sangre de 20 ml (equivalentes a 2 cucharadas) para la medición de indicadores sanguíneos y hormonas que permitirán descartar enfermedades que alteran la salud ósea (VHS; calcemia, fosfemia, fosfatasa alcalina, GOT, GPT, nitrógeno ureico, creatinina, TSH y leptina). Durante la cirugía se guardará una pequeña porción del tejido interno del hueso (médula). Esa muestra se llevará al laboratorio en el que se obtendrán las células. Una vez recuperada de la cirugía, usted debe venir al Policlínico del INTA en donde se le hará un examen llamado densitometría ósea, que permite saber si usted tiene o no osteoporosis. Este examen no es molesto ni invasivo, y representa una radiación equivalente a la de una radiografía dental.

¿Qué peligros podría experimentar en este estudio, y que harán los investigadores para reducir el riesgo, si es que lo hay?.

Usted no experimentará ningún riesgo adicional al de la cirugía que está indicada. Para la toma de sangre, lo hará personal especializado, para evitar que se origine un moretón (hematoma). La densitometría no representa ninguna molestia adicional excepto el tiempo necesario para el examen (30 minutos).

¿Qué harán los investigadores para asegurar que la información que recolectarán sobre mí, no caerá en manos equivocadas?

La información es guardada en fichas que se mantienen bajo llave, en el INTA de la Universidad de Chile, y a la que tienen acceso sólo los investigadores.

¿Qué beneficios personales puedo yo esperar al participar en este estudio?

Los exámenes indicados permitirán saber más con respecto a la salud de sus huesos, y el médico tratante le indicará el tratamiento más adecuado. Los costos de los exámenes y del traslado al INTA son de cargo del proyecto.

¿En qué podría este estudio beneficiar a otros?

El estudio permitirá conocer si la hormona leptina puede tener un efecto directo sobre las células que forman los huesos, este conocimiento puede ser importante para comprender el efecto de la obesidad en la salud de los huesos.

¿Qué harán los investigadores si sufro algún daño durante el estudio?

No sufrirá ningún daño, debido a que el estudio requiere sólo tomar una muestra de sangre y de orina y una densitometría ósea que no representan mayor riesgo.

¿Se cobrará a mí, o a mi ISAPRE, o compañía de seguros de salud, el costo de alguno de estos estudios?

Nó, el costo de dichos exámenes es por cuenta del proyecto.

¿Una vez que yo haya ingresado como sujeto de estudio, a quien tendría que dirigirme para averiguar mas acerca del estudio o para hacer llegar algun reclamo respecto al trato recibido?

Al investigador responsable: Juan Pablo Rodríguez V. (fono 678 1452, dirección Av. El Líbano 5524 Macul)

¿Si decido no participar en este estudio, qué me puede suceder, o qué otras opciones tengo si necesito tratamiento?

Si usted no participa, no tiene ninguna consecuencia en el tratamiento ya indicado por su médico.

2. DOCUMENTACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

¿Después que firme el documento, quién lo guardará?

El doctor Germán Seitz, colaborador del proyecto.

Yo.....RUT.....

he leído la información descrita y mis preguntas acerca del estudio han sido respondidas satisfactoriamente. Al firmar esta copia, indico que tengo un entendimiento claro de lo que se me solicita y deseo participar en el estudio.

.....
Firma de la voluntaria

.....
Fecha

CONSENTIMIENTO DEL INVESTIGADOR

Le he entregado toda la información sobre el estudio a la voluntaria invitada a participar en esta investigación. En mi opinión esta información es precisa y suficiente para que ella entienda completamente la naturaleza, los riesgos y beneficios del estudio.

No ha existido coerción ni influencia alguna. He sido testigo que la voluntaria firmó libremente el documento.

Nombre del Investigador _____

Firma del Investigador _____ Fecha _____