



UNIVERSIDAD DE CHILE

Determinación de BMP-2, Wnt-10b, Dkk-1 e irisina en el fluido de médula ósea de mujeres postmenopáusicas y su relación con la densidad mineral ósea, masa magra y masa corporal.

Magíster en Nutrición y Alimentos
Mención Nutrición Humana

Alumna: Natalia P. Flores Brito.
Director: Dr. Juan Pablo Rodríguez Vives.

Agradecimientos y financiamiento

A la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología, CONICYT, entidad que financió mis estudios de Magíster a través de la beca Magíster Nacional – 2014, y al Proyecto FONDECYT # 1130045, por el financiamiento otorgado para la realización de esta tesis.

Al Doctor Juan Pablo Rodríguez, director de mi tesis, quien me brindó su comprensión, dedicación, apoyo y orientación en cada etapa de este proceso.

A mi hija, Rafaela, quien me acompañó todo el proceso, desde su gestación hasta hoy. Mi motor y motivo de seguir en este camino y quien con su sonrisa alegra cada uno de los momentos de mi vida. Te amo siempre hija.

A mis padres, Mariana y Patricio, apoyo incondicional, no sólo en este proceso, sino también en mi vida, lo que hoy soy es gracias a los valores y amor que siempre nos entregaron. Gracias por estar siempre y apoyar cada uno de nuestros pasos, los amo.

A mi hermano, José, mi motivador, ejemplo de superación y perseverancia, te admiro mucho. Gracias por tu incondicionalidad y por cada palabra de apoyo y aliento, te amo.

A Pablo, por postergar muchas veces su trabajo, para cuidar de nuestra hija, apoyándome para viajar a reuniones, avances y otras actividades. Gracias por tu apoyo.

A mis familiares y amigos, por su comprensión y apoyo incondicional.

Índice

Resumen	5
Summary	7
Introducción	9
1. <i>Remodelamiento óseo normal</i>	9
2. <i>Osteoporosis y Sarcopenia</i>	10
3. <i>Células progenitoras mesenquimáticas (MSCs): microambiente</i>	12
4. <i>Conversación entre vías de diferenciación: osteoblastogénica, miogénica y adipogénica</i>	13
5. <i>Factores reguladores</i>	15
6. <i>Propuesta de tesis</i>	19
Materiales y métodos	21
Resultados	23
1. <i>Características demográficas de la población</i>	23
2. <i>Niveles de BMP-2, Wnt-10b, Dkk-1 e irsina en el FMO de donantes control y osteoporóticas de la submuestra</i>	28
3. <i>Correlación entre datos demográficos y niveles de factores medidos en FMO de donantes controles y osteoporóticas de la submuestra</i>	29
Discusión	32
Conclusiones	39
Bibliografía	40
Anexos	52
1. <i>Consentimiento Informado</i>	52
2. <i>Acta de aprobación Comité de ética Instituto de Nutrición y Tecnología</i>	

<i>de los Alimentos</i>	57
3. <i>Acta de aprobación Comité de ética Hospital Sótero del Río</i>	59
4. <i>Acta Confirmación de aprobación del Comité de ética Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos</i>	61

Figuras y tablas

Figura 1: Factores humorales producidos por tejido óseo y/o muscular y sus efectos entre sí	14
Figura 2: Vía de señalización Wnt/ β -catenina en ausencia y presencia del ligando Wnt	17
Figura 3: Vía de señalización Wnt/ β -catenina en ausencia y presencia del ligando Dkk	17
Tabla 1: Características demográficas de la muestra total	24
Tabla 2: Características demográficas de la submuestra	25
Figura 4: Correlación entre edad, t-score e IMMAE de los grupos control y osteoporóticas de la muestra total	25
Tabla 3: Correlación de datos demográficos de la submuestra	26
Figura 5: Distribución de las muestras	28
Tabla 4: Niveles de factores en FMO en muestras controles y osteoporóticas de la submuestra	29
Tabla 5: Correlación datos demográficos y factores medidos en el FMO de la submuestra	29
Figura 6: Correlación entre t-score y los factores medidos en el FMO de las donantes control y osteoporóticas de la submuestra	30
Figura 7: Correlación entre edad y niveles de Irisina en FMO de donantes control y osteoporóticas	31

Resumen

Introducción:

El remodelamiento óseo normal se produce a través de los procesos de resorción y formación ósea, los que a nivel celular dependen de la actividad de osteoclastos, derivados de células madres hematopoyéticas, y osteoblastos, derivados de células progenitoras mesenquimáticas (MSCs), respectivamente. Las MSCs se encuentran presentes, entre otros tejidos, en el estroma de la médula ósea y se caracterizan por su capacidad de diferenciarse hacia diferentes fenotipos celulares, incluyendo osteoblastos, adipocitos y miocitos. Residen en un microambiente que juega un rol fundamental en el destino y diferenciación de las MSCs debido a diversos factores que interactúan dentro de este medio. Entre estos, BMP-2 es ampliamente conocido por su rol en la estimulación de MSCs hacia osteoblastogénesis y adipogénesis, los ligandos Wnt-10b y Dkk-1 producen efectos sobre la vía Wnt/ β -catenina, activándola e inhibiéndola, respectivamente, con el consiguiente efecto sobre la osteoblastogénesis. Por último, irisina, un factor secretado por el músculo esquelético, juega un rol importante en la diferenciación de MSCs hacia el linaje osteoblastogénico. En esta tesis se propone medir los niveles de moléculas reguladoras presentes en el fluido de médula ósea de donantes osteoporóticas y controles. Los factores reguladores elegidos para su medición son BMP-2, Wnt10b, Dkk-1 e irisina.

Objetivo general:

Comparar la composición del microambiente medular de las MSCs a través de la medición de factores regulatorios específicos en el fluido de médula ósea de donantes osteoporóticas y donantes controles.

Metodología:

Las donantes (24), corresponden a mujeres postmenopáusicas de entre 60 y 75 años de edad, que se sometieron a cirugía por tratamiento de fractura ósea o artroplastia, y se clasifican en controles u osteoporóticas de acuerdo a su densidad mineral ósea (t-score) medida por absorciometría de rayos X de energía dual (DEXA). Además, se obtiene el porcentaje de grasa, índice de masa corporal e índice de masa muscular. El fluido de médula ósea (FMO) se obtuvo de la centrifugación de la muestra de aspirado de médula ósea. La medición de los factores BMP-2, Wnt-10b, Dkk1 e irisina se realizó en el FMO utilizando Kits ELISA disponibles comercialmente y de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes. Los datos fueron analizados mediante T student y correlación de Pearson. Se consideró significativo $p < 0,05$.

Resultados:

El peso y el porcentaje de grasa corporal son significativamente mayores en las mujeres del grupo control al compararlo con las osteoporóticas ($66,2 \pm 9,3$ vs $57,9 \pm 10,4$ y $45,0 \pm 6,7$ vs $35,0 \pm 9,0$; con $p = 0,03$ y $p = 0,01$, respectivamente). No existe relación evidente entre incidencia y/o prevalencia de osteoporosis y sarcopenia. Las concentraciones de BMP-2 e irisina son significativamente más altas en muestras controles que en muestras osteoporóticas (222 ± 97 vs 155 ± 73 y $5,2 \pm 0,5$ vs $4,8 \pm 0,4$ con $p = 0,04$ y $p = 0,02$, respectivamente). La concentración de irisina en FMO no depende del índice masa muscular ($r = 0,09$ y $p > 0,05$), sino más bien de la DMO de las donantes ($r = 0,47$ y $p = 0,02$).

Conclusión:

Las mujeres osteoporóticas tienen menor peso, masa muscular y porcentaje de grasa que las mujeres controles, por lo que el peso corporal podría tener un efecto protector frente al desarrollo de osteoporosis. Los niveles de BMP-2 e irisina son significativamente mayores en mujeres controles que en osteoporóticas. La medición de factores es diferente en el FMO de donantes controles y osteoporóticas, lo que reflejaría una composición particular del microambiente

Summary

Introduction:

Normal bone remodeling occurs through both bone resorption and formation processes, which at the cellular level depend on the activity of osteoclasts, derived from hematopoietic stem cells, and osteoblasts, derived from mesenchymal progenitor cells (MSCs), respectively. MSCs are present, among other tissues, in the stroma of the bone marrow and are characterized by their ability to differentiate into different cell phenotypes, including osteoblasts, adipocytes and myocytes. They reside in a microenvironment that plays a fundamental role in the fate and differentiation of MSCs due to various factors that interact within this environment. Among these, BMP-2 is widely known for its role in the stimulation of MSCs towards osteoblastogenesis and adipogenesis, the Wnt-10b and Dkk-1 ligands produce effects on the Wnt / β -catenin pathway, activating and inhibiting it, respectively, with the consequent effect on osteoblastogenesis. Finally, irisin, a factor secreted by skeletal muscle, plays an important role in the differentiation of MSCs into the osteoblastogenic lineage. In this thesis it is proposed to measure the levels of regulatory molecules BMP-2, Wnt10b, Dkk-1 and irisin present in the bone marrow fluid of osteoporotic and controls donors. .

General objective:

To compare the composition of the bone marrow microenvironment of the MSCs through the measurement of specific regulatory factors in the bone marrow fluid of osteoporotic and control donors.

Methodology:

Donors (24) correspond to postmenopausal women between 60 and 75 years old, who underwent surgery for bone fracture or arthroplasty, which are classified as controls or osteoporotic according to their bone mineral density (t-score) measured by dual energy X-ray absorptiometry (DEXA). In addition, the percentage of fat, body mass index and muscle mass index are obtained. Bone marrow fluid (BMF) was obtained after centrifugation of the bone marrow aspirate sample. Measurements of the BMP-2, Wnt-10b, Dkk1 and Irisin were performed on the FMO using commercially available ELISA Kits and according to manufacturer instructions. Data were analyzed using T student and Pearson correlation. It was considered significant $p < 0.05$.

Results:

Weight and body fat percentage were significantly higher in the control women compared to osteoporotic women (66.2 ± 9.3 vs 57.9 ± 10.4 and 45.0 ± 6.7 vs. 35.0 ± 9.0 , with $p = 0.03$ and $p = 0.01$, respectively). There is no evident relationship between

incidence and / or prevalence of osteoporosis and sarcopenia. The concentrations of BMP-2 and irisin were significantly higher in control than in osteoporotic samples (222 ± 97 vs 155 ± 73 and 5.2 ± 0.5 vs 4.8 ± 0.4 with $p = 0.04$ and $p = 0.02$, respectively). The concentration of irisin in BMF does not depend on the muscle mass index ($r = 0.09$ and $p > 0.05$), but rather on the BMD of donors ($r = 0.47$ and $p = 0.02$).

Conclusion:

Osteoporotic women have lower weight, muscle mass and fat percentage than women controls, so body weight could have a protective effect against the development of osteoporosis. BMP-2 and irisin levels are significantly higher in controls than in osteoporotic women. Factor measurement is different in BMF from controls and osteoporotic donors, reflecting a particular composition of the microenvironment.

Introducción

1. Remodelamiento óseo normal

El tejido óseo, al igual que otros tejidos, está en constante remodelación lo que le confiere al esqueleto su capacidad regenerativa y de adaptación funcional. El remodelamiento óseo normal se produce a través de los procesos de formación y resorción ósea, los cuales a nivel celular dependen de la actividad de osteoblastos y osteoclastos, respectivamente. En condiciones normales, estos procesos están estrechamente regulados.

Los osteoblastos son las células responsables de la formación ósea, derivan de las células progenitoras mesenquimáticas (MSCs) y están presentes, entre otros tejidos, en el estroma de la médula ósea. Representan una población de células madre adultas multipotentes con capacidad de diferenciarse hacia diferentes fenotipos celulares, incluyendo osteoblastos, adipocitos y miocitos, entre otros. La formación del hueso involucra la proliferación de las células progenitoras, la migración de las células progenitoras osteogénicas a la superficie del hueso y su diferenciación a osteoblastos. Estas últimas células secretan abundantes proteínas de matriz extracelular, sobre la cual se produce el depósito de calcio.⁽¹⁾

Por su parte, los osteoclastos, células responsables de la resorción ósea, derivan de precursores de células madres hematopoyéticas de linaje monocito/macrófago en la sangre y médula ósea.⁽²⁾ La resorción corresponde al proceso mediante el cual los osteoclastos eliminan tejido óseo, liberando minerales, lo que resulta en una transferencia de ión calcio desde la matriz ósea a la sangre. En la edad adulta, las fases de resorción y formación ósea proceden coordinadamente, de forma tal que al final de cada ciclo, la masa ósea se mantiene. Esta coordinación es fruto de complejos mecanismos de control del remodelamiento, en los cuales intervienen tanto factores genéticos como locales del hueso, así como sistémicos (hormonales, nutricionales, neurales, mecánicos). Durante la infancia y adolescencia, debido a la acción combinada de factores genéticos, hormonales y ambientales, el proceso de formación excede a la resorción, por lo cual los huesos crecen tanto en largo como en espesor; cambian de forma, aumentando masa y densidad ósea, llegando a un equilibrio que se alcanza entre los 30 y 40 años de vida. Sin embargo, posteriormente, como consecuencia del envejecimiento, hay una pérdida neta de hueso debido a que distintos factores influyen generando que el proceso de resorción exceda a la formación ósea, pudiendo producirse distintas enfermedades, dentro de las que destaca la osteoporosis.⁽³⁾

2. Osteoporosis y sarcopenia

La unidad funcional músculo – hueso es la que nos permite estar de pie, movernos y protege nuestros órganos vitales.⁽⁴⁾ Se denomina sistema músculo esquelético a la interacción conjunta del tejido óseo y el músculo, ya que el funcionamiento de uno depende de la presencia y actividad del otro; está compuesto por huesos, músculos esqueléticos, tendones, ligamentos, cartílagos, articulaciones y otros tejidos conectivos que permiten la función y proporcionan a los seres humanos la capacidad de locomoción.⁽⁵⁾ Estos tejidos, huesos y músculos interactúan formando la “unidad funcional músculo – hueso”, que se define como el contenido mineral óseo por área de sección transversal muscular local y proporciona una medida de relación existente entre la resistencia ósea y la fuerza muscular.⁽⁶⁾

La pérdida de masa ósea (osteoporosis) y muscular (sarcopenia) son problemas de salud pública creciente.^(7,8) La osteoporosis es considerada como un padecimiento común, multifactorial, progresivo y debilitante de la arquitectura del esqueleto óseo. La sarcopenia, por su parte, puede ser considerada como el equivalente muscular de la osteoporosis, ya que da lugar a la falta de equilibrio, la reducción de la velocidad de marcha, caídas y fracturas. La combinación de la osteoporosis y sarcopenia es un contribuyente importante a la fragilidad en la población de adultos mayores.^(9,10)

La osteoporosis es una de las enfermedades óseas de más alta prevalencia entre las mujeres mayores, en la cual se produce un desequilibrio entre la resorción y formación del hueso, predominando el primer proceso, con lo cual se produce una disminución de la calidad y densidad mineral ósea, que conlleva finalmente a una mayor pérdida de masa ósea, aumentando el riesgo de sufrir fracturas.⁽¹¹⁾ En la actualidad, esta enfermedad ha sido reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como uno de los cinco principales problemas de salud pública mundial, debido al significativo impacto económico asociado principalmente a fracturas de cadera, una de las expresiones clínicas más frecuente de la osteoporosis, que conlleva una alta mortalidad durante el primer año de ocurrencia (12 a 20%), aún en países con alto desarrollo tecnológico.⁽¹²⁾

En nuestro país, son escasos los datos epidemiológicos recientes que demuestren la prevalencia de osteoporosis. El año 2007, Rodríguez, et al, seleccionaron a 555 mujeres entre 55 y 84 años para un estudio que analizaría la frecuencia de las fracturas vertebrales. Se utilizó como parámetro de medición la densidad mineral ósea (DMO), considerándose osteoporóticas aquellas mujeres que tuvieran t-score menor o igual a -2,5 DE de la densidad mineral ósea (DMO). El estudio reveló que el 14% de las mujeres tenían un t-score de -2,5 de DMO o menos en la cadera, mientras que el 32% tenía un t-score de -2,5 de DMO en la columna vertebral. Para las participantes de entre 80 y 85 años, la osteoporosis en el cuello femoral alcanzó un índice de 53,3%.⁽¹³⁾

Datos proporcionados por la Fundación Chilena de Osteoporosis (FUNDOP) de un estudio realizado en el año 2009, donde se evaluó a 10.350 individuos, (81% mujeres), de edad promedio $56,6 \pm 15,7$ años, se encontró que 5,09% de las mujeres presentaban osteoporosis (T-score $\leq -2,5$) y 43,33% osteopenia (t-score $-2,49$ a $-1,0$), mientras que de los hombres 2,38% presentaron osteoporosis y 28,05% osteopenia.⁽¹⁴⁾ Los datos oficiales del Ministerio de Salud indican que los egresos hospitalarios por fractura de cuello de fémur en Chile fueron 3.953 en el año 2001 y 5.350 en el año 2006, con una tasa de fractura de cadera en mujeres mayores de 65 años de 278/100.000 habitantes.

La mayor prevalencia de osteoporosis se observa en mujeres menopáusicas y postmenopáusicas, en quienes los niveles plasmáticos de estrógenos disminuyen ocasionando lo que se conoce como “deprivación hormonal” de los osteoblastos. El aumento de la actividad osteoclástica en respuesta a la disminución estrogénica se produce en desmedro de la actividad osteoblástica, generando un balance negativo en el recambio óseo y por consiguiente la pérdida neta de masa ósea y el desarrollo de osteoporosis. Este tipo de osteoporosis se denomina osteoporosis tipo I, aunque el concepto adecuado sería osteoporosis hormono dependiente o peri menopáusica.⁽¹⁵⁾

Además del desequilibrio generado por el aumento de la actividad osteoclástica y disminución de la actividad osteoblástica, otro factor importante a considerar en la fisiopatología de la osteoporosis, es la mayor diferenciación de las MSCs hacia linaje adipogénico en desmedro de la diferenciación hacia linaje osteoblástico, que se ha observado en este tipo de pacientes. Aunque las causas de esto aún no son bien comprendidas, diversos estudios así lo han demostrado.⁽¹⁵⁾

La sarcopenia es una condición que está relacionada con la fragilidad, implica disminución de la masa y función muscular. Tiene una prevalencia de entre 11 y 50% en las personas mayores de 80 años, ocasionando deterioro de la función física, disminución de la calidad de vida y aumento de la mortalidad. Puede ser dependiente o independiente de la osteoporosis.

En términos generales, Rosenberg en 1989,⁽¹⁶⁾ definen la sarcopenia como la pérdida de masa muscular asociada a la edad, derivado del griego “sarcos” en referencias a la carne y “penia” a la falta de. Actualmente, la sarcopenia se define como un síndrome caracterizado por una pérdida de masa muscular progresiva y generalizada con pérdida de calidad y fuerza muscular esquelética; se acompaña de un aumento de riesgo de discapacidad física y reducción de la calidad de vida. Ésta pérdida es un proceso complejo y multifactorial, donde además de la edad, influyen factores como cambios de los niveles hormonales, muerte de neuronas motoras y sedentarismo, entre otros.⁽¹⁷⁾

Respecto a la prevalencia de sarcopenia, no hay un consenso debido a que esta varía según el método de diagnóstico. Baumgartner et al. (1998), describen que la prevalencia de sarcopenia alcanza entre 5 – 13% de la población de entre 60 y 70 años, y entre 11 y 50% en los mayores de 80 años.⁽¹⁸⁾ Más recientemente, Cruz-Jentoft et al. (2010) refieren que actualmente la sarcopenia afecta a más de 50 millones de personas y que en 40 años afectará a más de 200 millones de personas.⁽¹⁹⁾ En nuestro país, la prevalencia de sarcopenia, determinada a través de la utilización de puntos de corte adecuados a la población chilena por edad, ya que las características de la población Latinoamericana difieren de la europea, arroja un 10,6% en la población de 60 – 69 años, 17,1% entre 70 y 79 años y 32,1% en los mayores de 80 años, obteniendo un 13,5% de prevalencia total.⁽²⁰⁾

Dada la interacción funcional entre el músculo y el esqueleto cabe preguntarse si hay señales que relacionen directamente ambos tejidos, es importante mencionar que estos dos tejidos tienen una relación física íntima, una interacción a través de los puntos de inserción del músculo en los tendones y la interacción nerviosa que controla ambos tejidos. Entonces, ¿hay un medio propio de esta interacción?

3. Células progenitoras mesenquimáticas (MSCs): microambiente

Las células madre mesenquimáticas (MSCs, del inglés Mesenchymal Stem Cells), se clasifican en embrionarias y somáticas o adultas; en general comparten dos características distintivas: la auto-renovación y la capacidad de producir células diferenciadas. Las células madre embrionarias son pluripotentes, mientras que las MSCs presentes en el estroma de la médula ósea representan una población de células madre adultas multipotentes con capacidad de diferenciarse en diferentes fenotipos celulares.^(21, 22, 23)

Las MSCs permanecen durante la mayor parte de su vida en estado de reposo proliferativo hasta que señales específicas las conducen a reingresar en el ciclo celular ya sea para reponer el pool de células madre, o para que se diferencien hacia un linaje celular específico.^(24, 25, 26) El lugar donde las MSCs residen da lugar a un microambiente especializado (“nicho”) que presenta carácter dinámico,⁽²⁷⁾ permite su auto-renovación y, finalmente, su diferenciación.⁽²⁸⁾ En condiciones normales, la relación funcional entre los fenotipos que se encuentran en la médula ósea generan un microambiente distintivo a través de factores solubles producidos localmente, componentes de la matriz extracelular y factores sistémicos.^(29, 30) Sólo los componentes celulares primarios del estroma de la médula, generan una amplia gama de señales resultantes de la actividad de adipocitos, macrófagos, fibroblastos, células madre hematopoyéticas y su progenie, así como de células endoteliales y reticulares. Diversas citoquinas, factores de crecimiento, moléculas de adhesión y moléculas de matriz extracelular se

integran en el microambiente influyendo en el destino de las células madre, ya sea para apoyar la auto-renovación o determinar el compromiso de diferenciación hacia un fenotipo específico.^(24-26, 31, 32) En este microambiente puede influir la actividad muscular tan íntimamente asociada al esqueleto, ya sea por la actividad de la tensión sobre el hueso y/o el cartílago o en la microcirculación.

El destino de las MSCs parece estar determinado en etapas muy tempranas de la diferenciación celular (“commitment”); durante este período, la interacción de condiciones intrínsecas (genéticas) y ambientales (locales y/o sistémicas) pueden delinear el destino de la célula hacia uno de los linajes posibles.⁽³³⁾ La combinación adecuada de las señales intrínsecas y extrínsecas conduce a la activación de los factores de transcripción específicos. Como se mencionó anteriormente, en la médula ósea las MSCs son precursoras comunes para la formación de hueso, músculo y grasa; el compromiso y la diferenciación de MSCs hacia un fenotipo específico depende de factores sistémicos y locales que regulan la expresión y/o actividad de genes maestros en la diferenciación como Runx2, MyoD y PPAR γ , para la osteogénesis, miogénesis y adipogénesis respectivamente.

Aunque existen dudas acerca de los eventos celulares y moleculares implicados en el compromiso de las MSCs, se reconoce que su regulación es compleja y dependiente del tiempo.^(29, 30) Diferentes estudios postulan que hay una relación recíproca entre las vías de diferenciación que podría seguir un MSCs, la alteración de esta, por ejemplo, facilitaría la formación de tejido adiposo en la médula ósea a expensas de la formación de osteoblastos y disminuyendo por tanto, la masa ósea. Esta situación podría repercutir también generando una disminución en la diferenciación de miocitos. Esta condición de desequilibrio del destino de diferenciación de las MSCs podría estar ocurriendo en la médula ósea en los pacientes con osteoporosis/osteopenia.

4. Conversación entre vías de diferenciación: osteoblastogénica, miogénica y adipogénica

Un estudio que analizó mediante histomorfometría biopsias de cresta ilíaca de mujeres mayores, demostró que la médula ósea de mujeres con osteoporosis tiene una acumulación de adipocitos mayor que los niveles observados en mujeres jóvenes sanas.⁽³⁴⁾ Estudios posteriores han confirmado mayor adiposidad en la médula ósea de mujeres con osteoporosis, así como una asociación negativa entre grasa en la médula ósea y la velocidad de formación de hueso.⁽³⁵⁻³⁷⁾ A pesar de estos antecedentes, hasta hace poco la infiltración grasa de la médula ósea se había considerado como una secuela irrelevante del envejecimiento normal. Recientemente, se ha propuesto que en

pacientes osteoporóticas la acumulación de tejido adiposo en la médula ósea se contrarresta con una disminución en la producción de células osteogénicas.^(38, 39)

La interrelación de diferenciación entre MSCs y miocitos, es menos clara pero hay pérdida de masa muscular y ósea asociada al envejecimiento. Además, se observa una mayor adiposidad en la médula ósea como en el tejido muscular, asociado a infiltrados grasos en los nervios y capilares.⁽⁴⁰⁾

Evidencias de la embriología en el crecimiento y función muscular adulta, proponen que la masa magra se relaciona positivamente con la masa ósea, mientras se mantenga la integridad muscular hay una reducción en la posibilidad de sufrir fracturas. La interacción entre el músculo y el hueso, ya sea en el control local del músculo sobre el hueso (tensión) y/o interacciones humorales sistémicas entre el músculo y el hueso.^(41, 42) Estudios indican que el aumento de masa muscular está relacionado con el aumento de la densidad mineral ósea (DMO) y con una disminución del riesgo de fracturas, especialmente en las mujeres posmenopáusicas.⁽⁴³⁾ Además de la interacción funcional, se ha propuesto que también hay una comunicación a través de factores humorales, por ejemplo, citoquinas proinflamatorias, principalmente el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), que induce la diferenciación de células del estroma presentes en el músculo a células osteoprogenitoras y promueve la reparación de fracturas óseas.⁽⁴⁴⁾ Además, un estudio reciente demostró, que las células madre derivadas del músculo adquieren un papel primordial en la respuesta reparadora de una lesión grave en el periostio.⁽⁴⁵⁾

La interacción a través de factores humorales, podrían tener efectos anabólicos y/o catabólicos sobre el metabolismo de las células óseas y musculares. Esto plantea la posibilidad de que podría haber factores humorales que se producen en los tejidos que afecten los huesos y viceversa, favoreciendo o inhibiendo la función de estos tejidos (Figura 1).⁽⁴³⁾

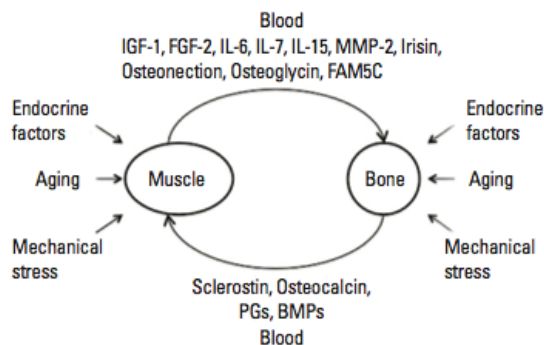


Figura 1: Factores humorales producidos por tejidos óseo y/o muscular y sus efectos entre sí. Figura tomada de Kahi H. 2013.⁽⁴³⁾

5. Factores reguladores

Existe una amplia gama de factores que puede interactuar en huesos y músculo, por tanto, por limitaciones económicas y por el enfoque de nuestro estudio, nos ha interesado estudiar los factores BMP-2, Wnt10b, Dkk-1 e irisina, ya que pueden actuar en las vías osteoblastogénica, miogénica y adipogénica.

Proteínas morfogenéticas del hueso (BMP)

Las proteínas morfogenéticas del hueso (BPM) pertenecen a la superfamilia de los factores de crecimiento transformantes beta (TGF- β) y están directamente relacionada con la condrogénesis, osteogénesis y la inducción de tejido conjuntivo.⁽⁴⁶⁾ Se caracterizan principalmente por su inmenso potencial osteoinductivo, ya que son capaces de promover la formación de hueso nuevo mediante la estimulación de las células osteoprogenitoras para diferenciarse en osteoblastos.^(47, 48)

Dentro de las BMP, BMP-2, BMP-4, BMP-6 y BMP-7 son los mediadores bien establecidos de los osteoblastos y/o diferenciación de miocitos y adipocitos a partir de MSCs⁽⁴⁹⁻⁵⁵⁾ BMP-2 es una proteína que actúa como factor de crecimiento capaz de inducir la formación del hueso y cartílago mediante la estimulación de la diferenciación de los osteoblastos y los condrocitos en diversos tipos celulares.^(56, 57) A su vez, se ha descrito que BMP-2 inhibe la diferenciación miogénica en mioblastos, debido a que induce la transcripción de Id1, un inhibidor para la miogénesis.⁽⁵⁸⁾

La exposición de MSCs a BMP ha mostrado como resultado el aumento de la expresión de marcadores específicos de osteoblastos, incluyendo fosfatasa alcalina, osteocalcina, osteopontina y factores de crecimiento del tejido conectivo, entre otros.^(59, 63)

La vía de señalización de BMP se inicia con la unión del ligando a un receptor (BMPR2) que desencadena una serie de fosforilaciones que llevan a la activación del receptor BMPR1.⁽⁶⁴⁻⁶⁶⁾ Se han identificado siete receptores BMPRs tipo 1, entre estos, BMPR- IA (también llamado ALK-3), BMPR-IB (también llamado ALK- 6) y el receptor de activina I (también llamado ALK-2) que juegan roles importantes en la formación de tejido adiposo y del esqueleto.⁽⁶⁷⁾

La activación de los receptores desencadena una de dos vía de señalización: Smad-dependientes o Smad-independientes, los que terminan finalmente regulando la expresión génica,⁽⁶⁴⁻⁶⁶⁾ por ejemplo para el caso adipogénesis/osteogénesis el efecto de BMP-2 converge en última instancia en PPAR γ .^(68, 69)

Varios miembros de la familia BMP son secretados por los osteoblastos y regulan la masa ósea en una forma autocrina y paracrina, ya que inducen directamente la diferenciación de osteoblastos a partir de MSCs y mediante el aumento de la función de los osteoblastos diferenciados en la producción de matriz.^(70, 71) Modelos de ratones genéticamente modificados para receptores y ligandos BMP, o sus inhibidores endógenos han confirmado el papel esencial de la señalización de BMP en la formación ósea.^(72 – 78)

Vía Wnt/ β -catenina: Wnt-10b y Dkk-1

La vía Wnt/ β -Catenina es un importante regulador de la masa ósea.⁽⁷⁹⁾ Su activación promueve la diferenciación de MSCs hacia osteoblastos y bloquea la adipogénesis inhibiendo la expresión de los factores de transcripción C/EBP α y PPAR γ .⁽⁸⁰⁻⁸²⁾ Estudios experimentales en modelos animales mostraron que la vía activada incrementa la masa ósea, evitando tanto la pérdida ósea dependiente de hormonas como la inducida por la edad.⁽⁸⁰⁾

Los ligandos Wnts son una familia de glicoproteínas que ejercen efectos autocrinos y paracrinos mediante la unión a receptores frizzled (fzd), y coreceptores 5 y 6 relacionados a proteínas LDL (LRP5/6).⁽⁸¹⁾ En la vía Wnt/ β -catenina, ligandos Wnt median efectos río abajo por la estabilización de β -catenina, una proteína multifuncional implicada en la adhesión celular y la regulación transcripcional. La activación de esta vía se produce por la unión de ligandos Wnt a Fzd y LRP5/6 lo que induce señales intracelulares que se agrupan como vía canónica y no canónica, de las cuales la primera es la mejor conocida. El acontecimiento clave en la cascada canónica es la acumulación de la β -catenina en el citoplasma y su posterior translocación al núcleo donde modula la transcripción de diferentes genes regulando, de esta forma, el destino celular de las MSCs. En ausencia del ligando Wnt, la vía se mantiene inactiva debido a que la β -catenina citoplásmica se localiza dentro de una multi-proteína formando un “complejo de destrucción”. Dentro de éste, β -catenina es fosforilada permitiendo su ubiquitinación y la posterior degradación proteosomal (Figura 2).^(82, 91)

El ligando Wnt10b es un regulador establecido del destino de MSCs, que inhibe la adipogénesis y estimula la osteoblastogénesis influyendo, por ende, sobre la masa ósea *in vivo*. El primer estudio que une la vía Wnt a la adipogénesis demostró que la expresión de Wnt10b disminuye durante la adipogénesis *in vitro* y que la expresión ectópica de Wnt10b inhibe la adipogénesis mediante la supresión de la expresión de los factores de transcripción adipogénicos, PPAR γ y CCAAT/potenciador de unión proteína- α (C/EBP).⁽⁸³⁻⁸⁵⁾ Numerosos estudios adicionales se han centrado en Wnt10b como el candidato que regula el destino de las MSCs. Por otra parte, los ratones

transgénicos (FABP4-Wnt10b) que sobre expresan Wnt10b en el tejido adiposo han reducido la adiposidad y son resistentes a la obesidad.^(86, 87) Esto demuestra que Wnt10b puede inhibir el desarrollo del tejido adiposo *in vivo*, además de aumentar la masa ósea de los ratones FABP4-Wnt10b; por el contrario, los ratones que carecen Wnt10b tienen disminuido el tamaño del hueso trabecular.⁽⁸⁸⁾ Estas observaciones condujeron a la identificación de Wnt10b como un regulador endógeno de la osteoblastogénesis y la formación ósea *in vivo*.^(89, 90) Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales Wnt10b ejerce estos efectos son poco conocidos.

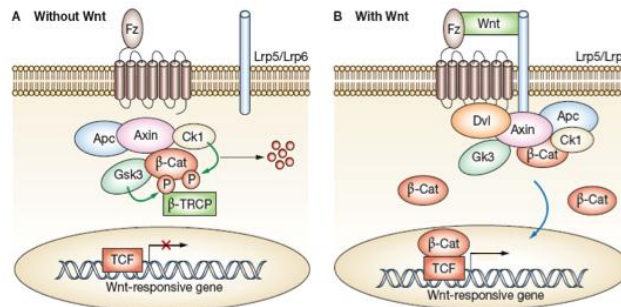


Figura 2: Vía de señalización Wnt/ β -catenina en ausencia (A) y presencia (B) del ligando Wnt. Figura tomada de Deal C, 2009⁽⁹¹⁾

La interrupción de la señalización de Wnt/ β -catenina promueve adipogénesis espontánea *in vitro*.^(85, 92, 93) Se han descrito diversos tipos de moléculas capaces de antagonizar las señales Wnt al unirse a distintos correceptores. Entre estos, la familia de las proteínas Dickkopf (Dkk), principalmente Dkk-1 y Dkk-2, han demostrado su rol en la inhibición de la vía canónica de señalización Wnt en diferentes organismos y tipos de células (Figura 3),^(94-101, 104) dando como resultado la inhibición de la osteoblastogénesis;⁽¹⁰²⁾ Dkk-1, secretado por osteoblastos y osteocitos, ha sido ampliamente estudiado y se sabe que inhibe la señalización de Wnt/ β -catenina en el metabolismo óseo mediante la unión al correceptor de Wnt, LRP5/6.^(100, 102, 103)

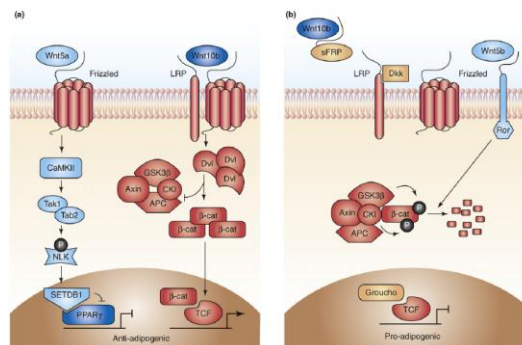


Figura 3: Vía de señalización Wnt/ β -catenina en ausencia (A) y presencia (B) del ligando Dkk. Figura tomada de Christodoulides C, et al. 2009⁽¹⁰⁴⁾

Estudios realizados en ratones han mostrado que Dkk-1 produce un aumento de la osteopenia mediante la reducción de la proliferación y la mineralización de osteoblastos, induciendo a estos al proceso de apoptosis.⁽¹⁰⁵⁻¹⁰⁸⁾ Además, otro estudio mostró que Dkk-1 estaba implicado en la homeostasis del hueso ya que se detectó un exceso de su expresión en células neoplásicas de pacientes con mieloma múltiple y lesiones osteolíticas generalizadas.⁽¹⁰⁹⁾ Esta observación sugirió que la inhibición de la señalización de Wnt en los osteoblastos por Dkk-1 derivados de células plasmáticas malignas interrumpen la capacidad de los osteoblastos a diferenciarse y/o funcionar eficazmente para depositar hueso nuevo.

Irisina

Años atrás, se propuso que irisina es una mioquina circulante, generada por el músculo esquelético y su producción es inducida por el ejercicio.⁽¹¹⁰⁾ Recientemente, se demuestra que también es producida por otros tejidos, como el adiposo; en particular, se ha detectado, en ratas, su producción por el tejido adiposo subcutáneo, demostrando su rol en el complejo eje músculo-hueso-grasa.⁽¹¹¹⁾

Zhang et al.⁽¹¹⁰⁾ y Boström et al.⁽¹¹²⁾ reportaron que irisina promueve la diferenciación de osteoblastos a través de la activación de la vía de Wnt- β -catenina e inhibe la diferenciación de los osteoclastos mediante la supresión del activador del receptor del ligando del factor nuclear-kappa B (RANKL)/ vía factor nuclear de células T activadas (NFAT) c1. La principal evidencia preclínica que relaciona irisina con el metabolismo óseo fue proporcionado por Colaianni et al.⁽¹¹³⁾ que muestra, que *in vitro*, se produce un aumento en la diferenciación de osteoblastos en presencia de medios condicionados por mioblastos maduros que expresan altos niveles de irisina; en este, muestran que irisina ejerce efecto de supresión de la esclerostina, conocido inhibidor de la vía de señalización Wnt. El mismo estudio refiere que la formación ósea mediada por irisina, está dada inicialmente por ATF4 (factor 4 activador de transcripción), seguido por la expresión de Runx2 (Runt relacionado con el factor de transcripción 2), la que a su vez desencadena un programa de osteogénesis global; aunque se necesitan más estudios, parece claro que ésta, es mediada por el receptor en el que la fosforilación de Erk (quinasa regulada por señal extracelular) es estimulada al aplicar la R-irisina. Además, por otra parte se demostró que los niveles plasmáticos de irisina fueron menores en mujeres con fracturas osteoporóticas previas.⁽¹¹⁴⁾

Sin embargo, aunque existe evidencia de que a mayor concentración de irisina se producen menos fracturas osteoporóticas, estudios anteriores no han dilucidado que la concentración de irisina se relacione directamente con la cantidad de masa magra o grasa. Sólo un estudio investigó la relación entre irisina y composición corporal

y el impacto de sus niveles en fracturas; en éste, mostraron que irisina está inversamente relacionada con fracturas vertebrales en mujeres postmenopáusicas, siendo la concentración de irisina independiente de la densidad mineral ósea y composición corporal. ⁽¹¹⁵⁾ Por lo tanto, está claro que irisina puede ser un factor protector óseo y/o ayudar a la formación ósea, pero no se ha encontrado la relación entre la concentración de irisina y masa muscular.

6. Propuesta de tesis

Una gran cantidad de factores de crecimiento y moléculas reguladoras desempeñan un papel fundamental en el logro de la competencia funcional de las MSCs, como parte del microambiente que rodea a las células progenitoras. Está demostrado que el microambiente juega un rol fundamental en la diferenciación y linaje de destino de las MSCs, como fue descrito anteriormente, y esto es debido a los factores que interaccionan dentro de este medio.

En esta tesis se propone medir los niveles de factores reguladores presentes en el fluido de la médula ósea de donantes osteoporóticas y controles. Debido a la organización anatómica y funcional de la interacción hueso – músculo, hay una gran dificultad en llegar a conocer el microambiente de estos. Por esta razón, hemos propuesto como modelo de aproximación a ese microambiente, el FMO, el cual se obtiene a través de un procedimiento sencillo de centrifugación de la muestra de médula extraída. Estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio, muestran que hay diferencias en varias señales reguladoras del FMO entre mujeres osteoporóticas y controles, además hay antecedentes que proponen que este fluido es diferente al plasma sanguíneo. ^(116, 117) En el presente trabajo, queremos conocer cuál es la relación, en el FMO, entre los factores medidos y los datos antropométricos de nuestras donantes.

Los factores reguladores elegidos para su medición son BMP-2, Wnt10b, Dkk-1 e irisina. BMP-2 se selecciona debido a que es un factor producido por los huesos que tiene un rol conocido en la estimulación de MSCs hacia la osteoblastogénesis, aunque también hacia la adipogénesis; también fueron seleccionados los ligandos Wnt-10b y Dkk-1 ya que ambos, producen efectos sobre la vía Wnt/ β -catenina; Wnt-10b juega un rol activador de la vía, favoreciendo por tanto la osteoblastogénesis, por el contrario DKK-1 se selecciona por su rol inhibidor de la vía, inhibiendo por tanto la formación ósea a favor de la diferenciación de adipocitos. Por último se selecciona irisina, que tal como se describe previamente es un factor secretado por el músculo esquelético que juega un rol importante en la diferenciación de MSCs hacia el linaje osteoblastogénico.

Hipótesis

La composición del microambiente de las MSCs, reflejado en el fluido de médula ósea obtenido de donantes osteoporóticas, en función de los factores reguladores BMP-2, Wnt-10b, Dkk-1 e irisina, es diferente al compararlo con el de donantes controles.

Objetivo general

Conocer la composición del microambiente medular de las MSCs a través de la medición de factores reguladores específicos en el fluido de médula ósea y su relación con parámetros antropométricos de donantes osteoporóticas y donantes controles.

Objetivos específicos

- Comparar el nivel de BMP-2, Wnt-10b, Dkk-1 e irisina en el fluido de médula ósea de donantes osteoporóticas y donantes controles.
- Relacionar los niveles de los factores regulatorios medidos en el fluido de médula ósea con la densidad mineral ósea (t-score) de donantes osteoporóticas y donantes controles.
- Relacionar los niveles de los factores regulatorios medidos en el fluido de médula ósea con el índice de masa muscular esquelética (IMMAE) de donantes osteoporóticas y donantes controles.

Materiales y Métodos

Sujetos

Se les solicitó donar una muestra de aspirado de médula ósea a mujeres postmenopáusicas de entre 60 a 75 años de edad, que requerían cirugía, como parte de su tratamiento, debido a fractura ósea o artroplastía. El procedimiento se realizó en la Sección de Traumatología del Hospital Sótero del Río, Santiago de Chile. Con anterioridad, las donantes firmaron un consentimiento informado, previamente aprobado por los comités de ética tanto del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA) como del Hospital Sótero del Río (se adjuntan en anexo).

La muestra de médula ósea se obtuvo mediante aspiración desde la cresta ilíaca durante el procedimiento quirúrgico.⁽¹¹⁸⁾ Con posterioridad a la cirugía, a cada donante se midió la densidad mineral ósea (DMO) en la columna lumbar (L2-L4) mediante absorciometría de rayos X de energía dual (DEXA) (LUNAR, Prodigy, General Electric Medical Systems, Madison, WI, USA). Los datos que entrega esta medición son: DMO, peso, talla, t-score, índice de masa corporal (IMC), masa muscular apendicular esquelética (MMAE) y porcentaje de grasa corporal.

El IMC corresponde a una medida de asociación entre el peso y la talla de un individuo, se obtiene mediante la fórmula: Peso/Talla^2 . Para estimar el significado de la masa muscular de los pacientes se utilizó el índice de masa muscular esquelética (IMMAE), que define un punto de corte de $5,88 \text{ kg/m}^2$, por sobre este valor se deduce que la persona tiene una masa muscular apropiada y por el contrario si se encuentra por debajo de él, se clasifica como sarcopénica. El valor se obtiene a través del MMAE, que corresponde a la suma de la masa magra (kg) de las piernas y los brazos en relación a la talla ($\text{IMMAE} = \text{MMA}/\text{Talla}^2$). Ésta definición de sarcopenia, se ajusta a la del consenso europeo.⁽²⁰⁾

Las donantes se clasificaron como controles u osteoporóticas utilizando el valor de su DMO según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud. En el grupo control se incluyen aquellas donantes que tenían un valor de t-score superior a -1 DE de la DMO media para los adultos jóvenes, mientras que las donantes osteoporóticas corresponden a aquellas que tenían un t-score inferior a -2,5 DE de la DMO.⁽¹¹⁹⁾

Todas las donantes se consideraban sanas, a excepción de la cirugía, y no estaban bajo terapia de reemplazo de estrógenos o tratamiento con glucocorticoides.

Para la realización de la tesis se contó con los datos demográficos ya mencionados de las donantes y las muestras del fluido de médula ósea de las mismas,

ya que son parte del proyecto FONDECYT #1130045, que se realiza en el laboratorio de Biología Celular del INTA.

Fluido de Médula Ósea (FMO)

El FMO se obtuvo después de centrifugar la muestra de aspirado de médula ósea (~2mL) durante 5 minutos a 600 x g.⁽¹²⁰⁾ Aproximadamente 500 a 800 µL de fluido de médula ósea fue recolectado y se mantuvo a -20°C hasta la medición de los factores regulatorios.⁽¹¹⁷⁾

Medición de factores reguladores

Se utilizaron Kit de ELISA disponibles comercialmente para la medición de los factores estudiados. Para la medición de Dkk-1 y BMP-2 se utilizaron los kits Quantikine ELISA, Human Dkk-1 Immunoassay (Catalog Number DKK100) y BMP-2 Immunoassay (Catalog Number DBP200, SBP200, PDBP200) respectivamente, ambos fabricados y distribuidos por R&D Systems (Minneapolis, USA). Irisina y Wnt-10b fueron medidos utilizando los ELISA kit, Irisin competitive BioAssay 044961 y Wingless Type MMTV Integration Site Family, Member 10b (Wnt10b) BioAssay 028924, ambos fabricados y distribuidos por USBiological Life Sciences (Massachusetts, USA). El procedimiento usado para la medición de los cuatro factores es el recomendado por los fabricantes de cada kit. Las determinaciones se realizaron en triplicado de 12 muestras controles y de 12 muestras osteoporóticas diferentes.

Análisis Estadístico

Todos los resultados fueron expresados como media \pm DE. Comparaciones entre los grupos no-osteoporóticas y osteoporóticas se realizaron mediante prueba t student de una cola; se utilizó coeficiente de correlación de Pearson para examinar la correlación bivariada. Se consideró que $p < 0,05$ representa una diferencia estadísticamente significativa. El peso, edad o ambos fueron ajustados a través del método lineal general.

Resultados

1. Características demográficas de la población

El laboratorio de Biología Celular del INTA cuenta con un banco de muestras de fluido de médula ósea (FMO) provenientes de mujeres postmenopáusicas donantes controles y osteoporóticas (n=139) (muestra total) y los datos demográficos de todas estas donantes. De estas, se seleccionó un total de 24 muestras, 12 controles y 12 osteoporóticas, basándose en el criterio de densidad mineral ósea de las donantes; estas 24 que corresponde a una submuestra de la muestra total.

En la tabla 1 se muestran los datos demográficos de las 139 mujeres postmenopáusicas (incluye la submuestra). De acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos, el grupo control incluye a aquellas donantes con un valor de t-score superior a -1 DE de la densidad mineral ósea (DMO) media para los adultos jóvenes, mientras que las donantes osteoporóticas a aquellas con un t-score inferior a -2,5 DE. El grupo control se conforma de 70 donantes y el grupo de osteoporóticas corresponde a 69 donantes.

En el valor de t-score se observa una diferencia significativa entre los grupos control y osteoporóticas (<0,003). En cuanto a la edad, las mujeres osteoporóticas son significativamente mayores al compararlas con el grupo control, 82,3 vs 78,2 años, respectivamente (p = 0,03).

Respecto al peso, índice de masa corporal (IMC) y porcentaje de grasa, son significativamente mayores en el grupo control al compararlos con las mujeres osteoporóticas (68,8 vs 59,0; 29,3 vs 25,4 y 47,0 vs 41,7 con valores p = 0,03, p = 0,03 y p = 0,009, respectivamente). Al comparar el índice de masa muscular esquelética (IMMAE) se observan diferencias significativas entre ambos grupos, siendo mayor en el grupo control respecto del grupo osteoporótico (6,0 vs 5,3; p = 0,04); sin embargo, ambos valores se encuentran cercanos al punto de corte (5,88). La talla no muestra diferencias significativas al comparar ambos grupos.

TABLA 1: Características demográficas de la muestra total

CONDICIÓN	ANTECEDENTES DEMOGRÁFICOS						
	Edad (años)	Peso (kg)	Talla (m)	T-Score	IMC (kg/m ²)	IMMAE	Grasa (%)
Control (n=70)	78,2 ± 8,5	68,8 ± 11,4	1,5 ± 6,0	0,2 ± 1,3	29,3 ± 4,5	6,0 ± 1,2	47,2 ± 8,3
Osteoporóticas (n=69)	82,3 ± 8,6	59,0 ± 10,7	1,5 ± 6,3	-3,4 ± 1,1	25,4 ± 4,2	5,3 ± 0,9	41,7 ± 8,9
Valor p	0,03*	0,02*	>0,05	0,003*	0,03*	0,04*	0,009*

* Los datos se expresan como promedio ± desviación estándar para los grupos control y osteoporóticas.

* T student: p<0,05

En la tabla 2 se muestran los datos demográficos de la submuestra, que corresponde a 24 mujeres postmenopáusicas. Al igual que la muestra total, las donantes son clasificadas en grupo control y osteoporóticas de acuerdo al criterio de los valores de t-score. Cada grupo quedó conformado por 12 donantes.

Al igual que en la muestra total, en el valor de t-score se observa una diferencia significativa entre los grupos control y osteoporóticas ($p = 0,0004$), ya que los grupos fueron conformados utilizando como criterio el valor de este parámetro. Al igual que en la muestra total, se observa una diferencia significativa en la edad de ambos grupos, siendo significativamente mayores las mujeres osteoporóticas respecto de las controles, 73 vs 69 años ($p=0,01$).

En cuanto a los parámetros peso, índice de masa corporal (IMC) y porcentaje de grasa, todos son significativamente mayores en el grupo control al compararlos con las mujeres osteoporóticas (66,2 vs 57,9; 29 vs 25,2; 45 vs 35; con un $p= 0,03$; $p= 0,02$ y $p= 0,01$, respectivamente).

En la submuestra no se observan diferencias significativas en el IMMAE de ambos grupos, sólo se observa una tendencia a ser mayor en el grupo control. Al comparar este dato con el obtenido en la muestra total, se observa en esta última un valor significativamente mayor en el grupo control. La talla no muestra diferencias significativas entre ambos grupos.

TABLA 2: Características demográficas de la submuestra

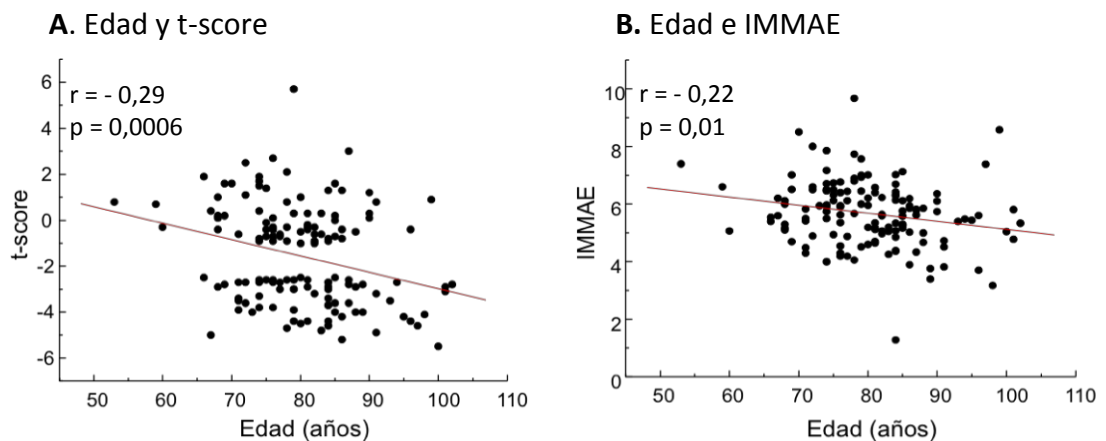
CONDICIÓN	ANTECEDENTES DEMOGRÁFICOS						
	Edad (años)	Peso (kg)	Talla (m)	T-Score	IMC (Kg/m ²)	IMMAE	Grasa (%)
Control (n=12)	71 ± 9,3	66,2 ± 9,3	1,5 ± 0,1	1,2 ± 0,8	29,0 ± 3,9	6,4 ± 1,0	45,0 ± 6,7
Osteoporóticas (n=12)	79,8 ± 8,9	57,9 ± 10,4	1,5 ± 0,1	-3,4 ± 0,0	25,2 ± 5,1	5,6 ± 1,2	35,0 ± 9,0
Valor p	0,01*	0,03*	>0,05	0,0004*	0,03*	>0,05	0,01*

* Los datos se expresan como promedio ± desviación estándar para los grupos control y osteoporóticas.

* T student: p<0,05

En la figura 4 se muestra la correlación entre edad y t-score, y edad e IMMAE de las mujeres del grupo control y osteoporóticas de la muestra total. Los resultados muestran que existe una correlación negativa tanto para la edad con t-score, como para la edad con IMMAE. Los resultados obtenidos, son similares a los descritos en la literatura, los que apuntan a una relación entre la pérdida tanto de densidad mineral ósea como de masa muscular asociada al proceso de envejecimiento.^(9, 10)

FIGURA 4: Correlación entre edad, t-score e IMMAE de los grupos control y osteoporóticas de la muestra total.



* Los datos presentados corresponden al valor r y valor p correspondientes a cada correlación.

* Test de Pearson, significancia p< 0,05

En la tabla 3 se muestran correlaciones entre los datos demográficos peso, talla, t-score, IMC, IMMAE y porcentaje de grasa de ambos grupos, control (n=12) y osteoporóticas (n=12) de la submuestra.

Se observa una correlación positiva entre las variables t-score y peso ($p=0,0176$). Ésta observación apoya la proposición de que el peso corporal podría ser un factor protector frente al desarrollo de osteoporosis. El IMC también se correlaciona de forma positiva con t-score ($p=0,034$).

IMMAE se correlaciona de forma positiva con las variables peso ($p<0,0001$) e IMC ($p<0,0001$) tanto en el grupo control, como en el grupo osteoporóticas.

Respecto a la grasa corporal, esta se correlaciona de forma positiva con las variables peso ($p=0,003$), t-score ($p=0,013$), IMC ($p=0,004$) e IMMAE ($p=0,021$).

Al correlacionar los datos de la muestra total, se observa que la submuestra se comporta de manera similar a esta, ya que los parámetros que muestran correlación significativa en la muestra de estudio, también muestran significancia en la muestra total. La única diferencia se obtiene al correlacionar los parámetros IMMAE y t-score, donde se observa una correlación positiva significativa entre ambos parámetros; resultado esperable debido a lo mencionado anteriormente.

TABLA 3: Correlación de datos demográficos de la submuestra

	Peso (kg)	Talla (m)	t-score	IMC (kg/m²)	IMMAE	Grasa (%)
Peso (kg)	1					
Talla (m)	0,15 ($>0,05$)	1				
t-score	0,48 (0,02*)	0,02 ($>0,05$)	1			
IMC (kg/m²)	0,88 ($<0,0001^*$)	0,32 ($>0,05$)	0,44 (0,03*)	1		
IMMAE	0,81 ($<0,0001^*$)	0,09 ($>0,05$)	0,34 ($>0,05$)	0,84 ($<0,0001^*$)	1	
Grasa (%)	0,58 (0,003*)	0,02 ($>0,05$)	0,50 (0,01*)	0,57 (0,004*)	0,47 (0,02*)	1

* Los datos presentados corresponden al valor r y valor p correspondientes a cada correlación.

* Test de Pearson, significancia $p<0,05$

Con el fin de evaluar el comportamiento de ambas muestras, se analiza la distribución de la población en cuanto a los valores de t-score y de IMMAE. Si bien el dato obtenido no indica temporalidad, por lo cual no se puede inferir si la osteoporosis ocurre antes o después de la sarcopenia, nos permite evidenciar que ambas patologías no se presentan necesariamente de forma simultánea. En el gráfico se puede determinar qué porcentaje de la población corresponde a mujeres controles, vale decir que no presentan osteoporosis ni sarcopenia, cual a donantes osteoporóticas no sarcopénicas, a donantes sarcopénicas no osteoporóticas y a donantes osteoporóticas y sarcopénicas.

La figura 5, A y B, muestran la distribución de la muestra total y submuestra, respectivamente, de acuerdo a los parámetros de t-score e IMMAE.

La línea “a” representa el punto de corte -2,5 DE del parámetro t-score, observándose a la izquierda de esta línea las donantes osteoporóticas. La línea “b” representa el punto de corte -1 DE del parámetro t-score, por lo cual a la derecha de ésta se observan las donantes control. La línea “c” representa el punto de corte 5,88 del parámetro IMMAE, que define el límite bajo el cual se encuentran las personas que presentan sarcopenia; por lo cual sobre esta línea se encuentran las donantes control y bajo esta las donantes sarcopénicas. Por lo tanto, el cuadrante superior izquierdo corresponde a donantes osteoporóticas con masa muscular normal, el cuadrante superior derecho corresponde a donantes controles con masa muscular y masa ósea normal, el cuadrante inferior izquierdo corresponde a donantes osteoporóticas y sarcopénicas, y el cuadrante inferior derecho corresponde a donantes controles respecto de la masa ósea y sarcopénicas de acuerdo a la masa muscular.

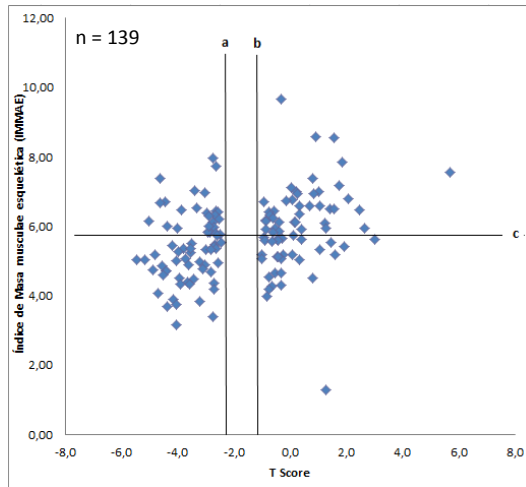
De la muestra total correspondiente a 139 mujeres, se observa que alrededor del 27% se ubica en la categoría control, tanto desde el punto de vista óseo como muscular (cuadrante superior derecho), por el contrario un 35,3% presenta osteoporosis y sarcopenia (cuadrante inferior izquierdo). El 15% de la población es osteoporótica, pero con un índice muscular normal (cuadrante superior izquierdo) y el 22% sarcopénica, con una densidad mineral ósea normal (cuadrante inferior derecho) (Figura 6A).

En cuanto a la submuestra (n=24) (Figura 6B), se observa una distribución más homogénea, el 29% corresponde a mujeres controles (cuadrante superior derecho), el 25% son mujeres osteoporóticas y sarcopénicas (cuadrante inferior izquierdo). El 25% es osteoporótica (cuadrante superior izquierdo) y el 21% es sarcopénica (cuadrante inferior derecho).

Por lo tanto, al comparar ambos grupos se observa que los grupos de mujeres control y sarcopénicas se comportan de forma similar en ambas muestras (total y submuestra).

FIGURA 5: Distribución de las muestras

A. Muestra total



B. Submuestra

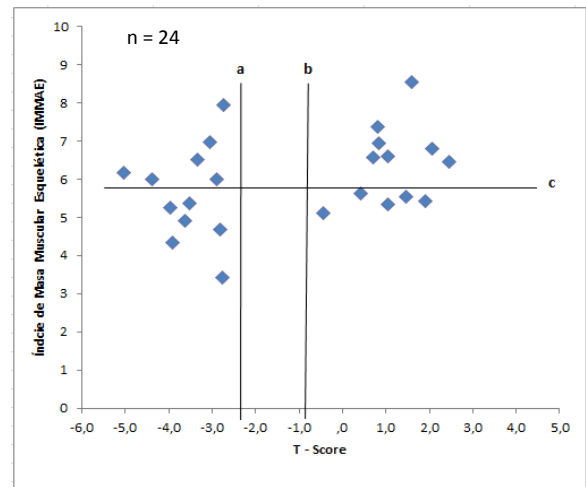


Fig 5A-B. a) Punto de corte -2,5 D.E t-score. **b)** Punto de corte -1 D.E t-score. **c)** Punto de corte 5,88 del parámetro IMMAE. Cuadrante superior izquierdo: donantes osteoporóticas, cuadrante superior derecho: donantes controles, cuadrante inferior izquierdo: donantes osteoporóticas y sarcopénicas, cuadrante inferior derecho: donantes sarcopénicas.

2. Niveles de BMP-2, Wnt-10b, Dkk-1 e irisina en FMO de donantes control y osteoporóticas de la submuestra.

En la tabla 4 se muestra el nivel de los factores BMP-2, Wnt-10b, Dkk-1 e irisina medidos en el fluido de médula ósea (FMO) de las donantes del grupo control y osteoporóticas de la submuestra. Estos factores juegan roles importantes en la diferenciación de MSCs, ya sea promoviendo la diferenciación hacia linaje osteoblastogénico (BMP-2, Wnt10b e irisina) o inhibiendo dicho proceso (Dkk-1).

En esta tabla, se observa que los niveles de los factores BMP-2 e irisina son significativamente mayores en el grupo control al compararlo con el grupo de donantes osteoporóticas ($p = 0,04$ y $p = 0,02$ respectivamente). En cuanto a Wnt-10b y Dkk-1 no se observan diferencias significativas entre ambos grupos.

Cabe mencionar que la variación que se observa en los valores de Dkk-1, correspondería a una actividad variable en la producción del factor Dkk-1, siempre hay presencia de este factor pero la cantidad es muy variable entre una muestra y otra.

TABLA 4: Niveles de Factores en FMO en muestras control y osteoporóticas de la submuestra

CONDICIÓN	FACTORES			
	BMP-2 [pg/ml]	WNT-10B [ng/ml]	DKK-1 [pg/ml]	IRISINA [ug/ml]
Control (n=12)	222 ± 97	14,6 ± 6,2	2111 ± 606,3	5,2 ± 0,5
Osteoporóticas (n=12)	155 ± 73	12,7 ± 3,7	1877 ± 716,6	4,8 ± 0,4
Valor p	0,04*	>0,05	>0,05	0,02*

* Los datos se expresan como promedio ± desviación estándar para los grupos control y osteoporóticas.

* T student: p<0,05

3. Correlación entre datos demográficos y niveles de factores medidos en FMO de donantes control y osteoporóticas de la submuestra

En la tabla 5 se muestran las correlaciones entre los datos demográficos IMC, IMMAE y porcentaje de grasa y los factores BMP-2, Wnt-10b, Dkk-1 e irisina medidos en el FMO de todas las donantes que forman la submuestra. No se encuentra correlación entre los datos analizados.

TABLA 5: Correlación datos demográficos y factores medidos en el FMO de la submuestra

	BMP-2 [pg/ml]	Wnt-10b [ng/ml]	Dkk-1 [pg/ml]	Irisina [ug/ml]
IMC (kg/mt ²)	0,25 (>0,05)	0,37 (>0,05)	0,19 (>0,05)	0,20 (>0,05)
IMMAE	0,27 (>0,05)	0,18 (>0,05)	0,06 (>0,05)	0,09 (>0,05)
Grasa (%)	0,008 (>0,05)	0,27 (>0,05)	0,03 (>0,05)	0,27 (>0,05)

* Los datos presentados corresponden al valor r y valor p correspondientes a cada correlación.

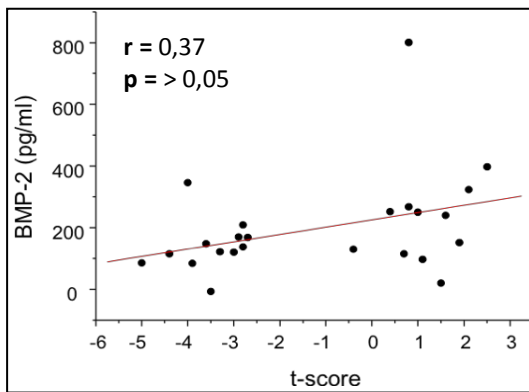
* Test de Pearson, significancia p< 0,05, entre paréntesis.

En la figura 6 se observan las correlaciones entre t-score y los factores BMP-2, Dkk-1, irisina y Wnt-10b medidos en el FMO de las donantes controles y osteoporóticas que forman la submuestra.

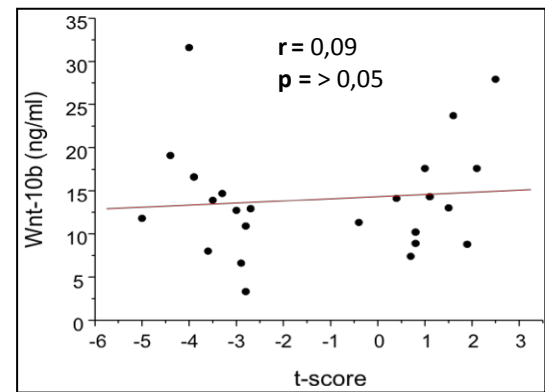
Se observa una correlación positiva entre irisina y t-score, por el contrario no se observan correlaciones significativas para los factores BMP-2, Wnt10b y Dkk-1, aun cuando BMP-2 tiene concentraciones significativamente más altas en el grupo control al compararlas con el grupo de osteoporóticas.

FIGURA 6: Correlación entre t-score y los factores medidos en el FMO de las donantes control y osteoporóticas de la submuestra

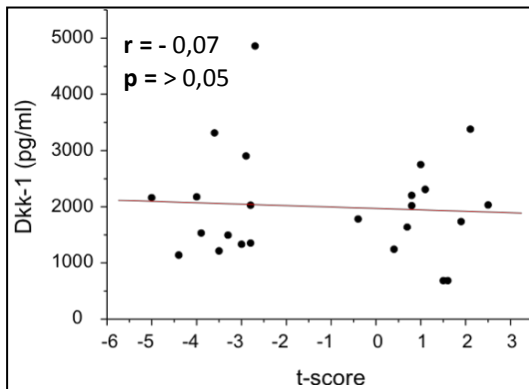
A. BMP-2



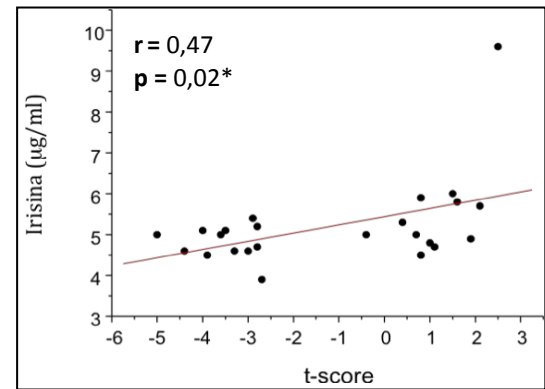
B. Wnt-10b



C. Dkk-1



D. Irisina



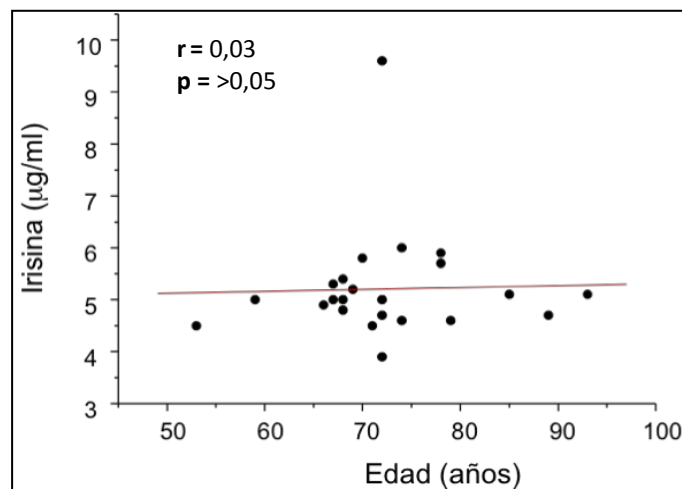
* Los datos presentados corresponden al valor r y valor p correspondientes a cada correlación.

* Test de Pearson, significancia $p < 0,05$.

En la figura 7 se muestra la correlación entre la edad y los niveles de irisina medidos en el FMO de donantes controles y osteoporóticas de la submuestra.

Como se describe previamente, irisina es una mioquina sintetizada y liberada por el músculo esquelético. A mayor edad hay menor masa muscular esquelética (Figura 5B), en base a esto quisimos analizar si la concentración de irisina en el FMO disminuye en función a la disminución de la masa muscular esquelética relacionada a la edad. Para esto, en la figura 7 se muestra la correlación entre la concentración de irisina en FMO y la edad de las donantes control y osteoporóticas de la submuestra. Como se puede apreciar, no se observa una correlación significativa entre los niveles de irisina en el FMO y la edad de donantes controles y osteoporóticas.

FIGURA 7: Correlación entre edad y niveles de irisina en FMO de donantes control y osteoporóticas de la submuestra



* Los datos presentados corresponden al valor r y valor p correspondientes a cada correlación.

* Test de Pearson, significancia $p < 0,05$, entre paréntesis.

Discusión

En esta tesis se analizaron factores reguladores presentes en el fluido de médula ósea (FMO) de donantes osteoporóticas y controles. Los factores elegidos para su medición fueron irisina, BMP-2, Wnt10b y Dkk-1. Además, también se analizaron los datos demográficos de dichas mujeres, con el objeto de establecer si existe relación entre dichos factores y alguno de los parámetros antropométricos medidos.

Con el objeto de determinar si las donantes que conformaron la submuestra donde se midieron los factores era representativa de una muestra más amplia, se analizaron los datos demográficos de una muestra mayor, formada por un total de 139 pacientes, siendo 70 de ellas controles y 69 donantes osteoporóticas, cuyos datos estaban disponibles en el laboratorio de Biología Celular del INTA. Al comparar los datos analizados en esta muestra mayor con los datos de la submuestra, se puede observar que la mayor parte de los datos demográficos de ésta, se comportan de manera muy similar a los de la muestra total, lo que indica que la submuestra seleccionada para este estudio se puede considerar como representativa de una población mayor.

Entre los datos analizados se encuentra la edad. Los resultados indican que las mujeres osteoporóticas de ambas muestras (de estudio y total) son significativamente mayores al compararlas con el grupo control. Existe evidencia que refiere mayor prevalencia de osteoporosis en mujeres postmenopáusicas, donde además de ser la edad un factor importante, la deprivación hormonal ejerce el mayor efecto sobre la incidencia de esta patología.⁽¹⁰⁾ Sin embargo, ambos grupos considerados en este estudio, donantes controles y osteoporóticas, son postmenopáusicas de edades relativamente similares, aun cuando se observe una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos y no todas se encuentren en la categoría de osteoporóticas. Esto apoya la idea que la osteoporosis es una patología cuyas causas son multifactoriales donde existen otros factores, además de la edad y la disminución de los estrógenos, que están incidiendo en el desarrollo de esta enfermedad.

El peso corporal, índice de masa corporal (IMC) y porcentaje de grasa, son significativamente menores en el grupo de mujeres osteoporóticas, en ambas muestras (total y submuestra). Por tanto, se puede suponer que el peso corporal y la grasa podrían actuar como factores protectores del hueso, evitando la pérdida de la masa ósea y de esta forma el desarrollo de la enfermedad. Esto se ve corroborado al hacer la correlación entre peso corporal y t-score, obteniéndose una correlación positiva entre ambas variables. Datos reportados en la literatura concuerdan con los datos reportados en esta tesis. Así, un estudio realizado en mujeres postmenopáusicas controles, osteopénicas y osteoporóticas, mostró una relación indirecta entre el IMC y el riesgo de osteoporosis; mujeres con menor IMC tenían un riesgo significativamente mayor de

osteoporosis en comparación con las que tenían peso corporal normal. El aumento de 1 punto de IMC se asoció a una disminución de 12% de riesgo de osteoporosis.⁽¹²¹⁾

En esta misma línea investigativa, un estudio reportado en la literatura analizó los factores de riesgo que influyen en la presentación de osteoporosis en 504 mujeres perimenopáusicas. Para medir la densidad ósea utilizaron tomografía computarizada cuantitativa en el extremo distal del radio, de esta manera establecen los grupos de mujeres con osteoporosis, osteopenia y control utilizando el mismo criterio utilizado en el estudio mencionado anteriormente. Además, para relacionar la osteoporosis con las distintas fases de la perimenopausia dividieron a las mujeres en 4 grupos, dependiendo si estaba establecida o no la menopausia. Los resultados muestran, que en todos los grupos estudiados, las mujeres con IMC más alto tienen menor tendencia a osteopenia-osteoporosis.⁽¹²²⁾

Se han propuesto dos mecanismos mediante los cuales la grasa y el peso corporal podrían actuar como factor protector del desarrollo de la osteoporosis. Por una parte, la grasa corporal extra aumenta la producción de estrógenos, los cuales protegen contra la pérdida rápida de hueso. Cuando el depósito de estrógenos es deficiente, aumenta el índice de recambio óseo que determina mayor pérdida ósea; por otra parte, se estima que los individuos obesos alcanzan mayor grado de DMO cuando son jóvenes en comparación con sujetos delgados, por lo que son menos propensos a presentar osteoporosis en la vejez. Además, en estos sujetos el peso corporal que los huesos tienen que soportar es mayor (haciendo que estos se hagan más fuertes) lo que a su vez puede aminorar el impacto de los golpes de una caída (protegiendo a los huesos de una fractura).⁽¹²³⁾

Si bien, algunos autores consideran que el peso corporal y la grasa corporal pueden ser factores protectores en el desarrollo de la osteoporosis, otros autores han reportado que esto se produce en presencia de sobrepeso leve, y por el contrario la obesidad sería un factor de riesgo en el desarrollo de la enfermedad. Así lo muestra un estudio realizado en 398 personas (291 mujeres y 107 hombres). En ellos se determinó la grasa corporal, la masa magra y DMO mediante DEXA, considerando la DMO de la columna lumbar; además, se realizan mediciones de peso y estatura para determinar el IMC. En base a esto, los participantes en este estudio se dividen en 3 grupos: sobrepeso, obesidad y obesidad grave. En el grupo con sobrepeso la mayor parte presenta DMO normal, mientras que en el grupo con obesidad y obesidad grave (IMC > 30) tenían alteraciones significativas de DMO, proponiendo que la obesidad podría ser considerada un estado inflamatorio, que se asocian con un aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias, algunas de las cuales son osteoclastogénicas, favoreciendo la pérdida de masa ósea.⁽¹²⁴⁾ Es importante mencionar que, a diferencia del estudio mencionado, las mujeres de ambas muestras de nuestro estudio presentan

un IMC entre 25 y 29,9 kg/m², es decir tienen un estado nutricional correspondiente a sobrepeso.

El punto de corte de sarcopenia para la población chilena, se obtiene a través de un estudio que consta de dos etapas: la primera, de predicción, donde se analizan los datos transversales para estimar puntos de corte propios del IMMAE en adultos mayores chilenos, medidos por DEXA y estimados por una ecuación de predicción, y la segunda, de validación, donde se realiza una validación transversal de los puntos de corte estimados por la ecuación de predicción y por DEXA, en una muestra de adultos mayores beneficiarios del sector público. Para el punto de corte de IMMAE disminuida se utiliza el percentil 20 (p20) de una muestra de adultos mayores chilenos de estudios previos (SABE y ALEXANDROS), valores posteriormente confirmados a través de su utilización en el algoritmo diagnóstico de sarcopenia del consenso europeo.⁽²⁰⁾

Al comparar la masa muscular de los grupos control y osteoporóticas de la submuestra, no se observan diferencias significativas, a pesar de que las mujeres del grupo control tienen una mayor masa muscular; mientras que en la muestra total si se observa una diferencia significativa. Cabe mencionar que el valor de IMMAE obtenido en el grupo control de la submuestra es mayor que el de la muestra total y se encuentra por sobre el punto de corte que se utiliza para definir sarcopenia (5,88 kg/m²). En cuanto a las mujeres osteoporóticas de la submuestra, éstas presentan un valor de IMMAE que se encuentra levemente bajo el punto de corte anteriormente mencionado. Al correlacionar las variables IMMAE y t-score tampoco se observa diferencia significativa en la muestra de estudio, pero si en la muestra total. Se observa que las mujeres osteoporóticas no solo tienen menor DMO sino también menor masa muscular. Se esperaba encontrar una correlación positiva entre estos dos parámetros, debido a que diversos estudios mencionan a la masa muscular como un factor protector de la masa ósea, e incluso refieren que la pérdida de ambos tejidos se produce de forma simultánea.⁽⁴¹⁻⁴³⁾

La diferencia observada entre la submuestra y la muestra total puede haberse generado debido a que el tamaño muestral utilizado en este estudio es pequeño, ya que probablemente si el número de donantes analizadas fuera mayor, ambos resultados serían coincidentes respecto de la significancia de las diferencias observadas en la muestra total. Esto propone que la masa muscular podría ser un posible factor protector, como lo han sugerido diferentes autores que refieren la producción de factores de crecimiento local por el tejido muscular esquelético, los que ejercen efectos anabólicos sobre los tejidos óseos.⁽⁴¹⁻⁴³⁾ Genaro et al. (2010) evaluaron la relación entre la masa magra, grasa y masa ósea en 65 mujeres postmenopáusicas con osteoporosis a quienes se les midió la DMO y el índice de músculo esquelético a través de DXA. Los resultados de ese trabajo demostraron que las mujeres con sarcopenia tenían una DMO significativamente más bajas en el fémur total y cuello femoral que las no

sarcopénicas, sugiriendo que la masa magra tendría un papel relevante en la DMO, jugando un rol protector sobre ésta.⁽¹²⁵⁾

La relación entre la masa ósea y masa muscular se puede explicar porque las células óseas y miocitos provienen de una célula progenitora común, por lo que se podría suponer que la disminución de la masa ósea y muscular podrían estar relacionadas. En esta tesis se analizó, en ambas muestras (total y submuestra), si la presencia de osteoporosis implica también la presencia de sarcopenia o viceversa, en función de los parámetros t-score e IMMAE. Los resultados muestran que no existe una relación evidente entre la incidencia y prevalencia de sarcopenia y osteoporosis. Se observa una distribución similar en los grupos de ambas muestras, que evidencia que la presencia de osteoporosis no implica necesariamente la presencia simultánea de sarcopenia y viceversa.

Si bien se ha descrito que la osteoporosis y sarcopenia se encuentran relacionadas, no se sabe con exactitud si una precede a la otra o si ocurren de manera simultánea,^(9,10,126) sin embargo, parece ser la edad el factor preponderante en la alteración de las vías de regulación. Los resultados obtenidos en esta tesis sólo reflejan un momento, no tenemos conocimiento de cuando se produce el inicio de osteoporosis, sarcopenia o ambas, ni tampoco cuál antecede a la otra. Sería interesante hacer un seguimiento a una cohorte para estudiar como es la evolución de la osteoporosis y la sarcopenia y si alguna de ellas precede a la aparición de la otra.

En esta tesis se ha propuesto que la medición de los factores solubles que se encuentran en el fluido refleja el microambiente en el que se encuentran las MSCs. Se ha demostrado que éste es un microambiente dinámico, donde los distintos factores que se encuentran en él generan una amplia gama de señales que determinan la decisión (“commitment”), diferenciación y maduración de las MSCs hacia los distintos linajes celulares.⁽³³⁾ Las MSCs interactúan a través de receptores específicos de superficie celular con la matriz extracelular, con moléculas de superficie de las células del nicho y con productos secretados por los diferentes tipos celulares presentes en el microambiente, lo que refleja la estrecha relación entre los componentes celulares de la médula ósea.⁽¹²⁷⁾ Por tanto, cambios en la concentración de algún o algunos factor(es) en este medio, pueden estar relacionados con la presencia o ausencia de alguna alteración del metabolismo óseo, como por ejemplo la osteoporosis. Hasta ahora, la medición de estos factores en pacientes osteoporóticas y controles se ha limitado a mediciones en el plasma circulante que podría no estar reflejando de buena forma lo que ocurre efectivamente en el fluido de médula ósea. Todos los estudios que se mencionarán más adelante midieron los niveles de Wnt10b, Dkk-1 e irisina en suero; sin embargo, por tratarse de grupos con ciertas características similares a nuestra muestra son considerados en el análisis; sin embargo, cabe recalcar que lo realizado en esta tesis no ha sido descrito previamente.

Recientemente, en nuestro laboratorio se analizó la concentración de citoquinas adipogénicas y proinflamatorias en el FMO de mujeres osteoporóticas, en este se observa que 7 de los 8 factores medidos se encuentran en concentraciones significativamente diferentes en ambos grupos.⁽¹¹⁶⁾ Posteriormente se analizó la composición de los ácidos grasos presentes en el FMO de donantes postmenopáusicas. En este estudio se compararon los niveles de distintos ácidos grasos tanto en FMO como en plasma sanguíneo encontrando diferencias significativas en 8 de los 12 ácidos grasos evaluados.⁽¹¹⁷⁾ Esto demuestra que el FMO no corresponde a un filtrado de suero, sino un medio que genera un microambiente particular importante para el desarrollo celular. Esto apoya el interés de nuestro estudio de analizar las concentraciones de los distintos factores en este fluido.

En cuanto a los factores medidos en la submuestra, se observa que a mayor DMO hay una concentración de BMP-2 e irisina significativamente mayor. BMP-2 es un factor que promueve la formación ósea, por lo tanto el resultado obtenido refleja dicha característica, ya que las mujeres que no presentan la enfermedad tienen niveles más altos de este factor.

Chen et al, (1998), estudiaron el rol de los receptores de BMP-2 en la diferenciación de MSCs precursoras de los linajes osteoblastogénico y adipogénico; para lo cual, analizaron una línea celular provenientes de calotas de ratón. En esta línea celular se encuentra que BMP-2 induce la diferenciación de osteoblastos maduros.⁽¹²⁸⁾ Otro estudio en ratones genéticamente modificados para receptores y ligandos BMP, o sus inhibidores endógenos, han confirmado el papel esencial de la señalización de BMP-2 en la formación ósea⁽⁷²⁾, apoyando los resultados obtenidos en nuestro estudio. Si bien ambos estudios mencionados son realizados en modelos animales, son mencionados y comparados con nuestro estudio, ya que no existen estudios en humanos que analicen la concentración de BMP-2 y su relación con la osteoporosis en plasma ni tampoco en FMO.

Se ha descrito que irisina, factor secretado por el músculo, también estimula la formación de la masa ósea. En este trabajo se observa una mayor concentración de este factor en las mujeres del grupo control al compararlas con las osteoporóticas, resultado que está de acuerdo a los descritos en la literatura.⁽¹¹⁴⁾ Sin embargo, al asociar este resultado a los datos de T-Score (indicador de masa ósea) e IMMAE (indicador de masa muscular esquelética, órgano secretor de irisina), se observa que estos no muestran una correlación positiva, aunque irisina exhibe una tendencia a ser mayor en el grupo control al compararlo con el grupo de las donantes osteoporóticas. Bajo esta relación, asociando la concentración de irisina con la DMO, diversos estudios analizan los niveles de irisina circulante en suero asociado a fracturas, proponiendo que los niveles de esta, se asocian con fracturas osteoporóticas en mujeres

postmenopáusicas (con baja DMO) y confirmando la existencia de una correlación inversa entre los niveles de irisina y fracturas vertebrales. En los estudios mencionados previamente el comportamiento de irisina es similar al observado en nuestro estudio (mayor concentración en controles), sin embargo nuestros resultados muestran una concentración de irisina en FMO alrededor de 10 veces mayor al que se ha observado en plasma.^(115, 130) Esto apoyaría el interés que tiene realizar las mediciones en el FMO.

Palermo et al, (2015), analizan la correlación de irisina con la masa muscular, no encontrando correlación con este parámetro demográfico.⁽¹¹⁵⁾ Este último resultado también apoya lo encontrado en nuestro estudio, ya que al analizar la concentración de irisina según IMMAE (considerando un grupo sarcopénico y otro control), no se encuentran diferencias significativas para los niveles de este factor (datos no mostrados).

Hay controversia de la validez de la medición de irisina;⁽¹³¹⁾ sin embargo, con otros métodos (espectrometría) se confirmó que irisina está presente en el plasma y que es regulado por el ejercicio.⁽¹³²⁾ Aun así, dado el interés que tenía la medición de irisina como señal de la actividad muscular, se decide realizar la medición de este y en nuestra experiencia, el método parece confiable debido a que las mediciones guardan proporción en la curva estándar.

La activación de la vía de señalización Wnt es esencial para el desarrollo y formación de un hueso sano. Dentro de los ligandos que activan esta vía induciendo la osteoblastogénesis se encuentra Wnt10b. Este factor fue medido en el FMO de las donantes de nuestro estudio, con el fin de evaluar si cambios en la concentración de este factor en las muestras de las donantes osteoporóticas podrían dar cuenta de un funcionamiento defectuoso de la vía de señalización Wnt y por consiguiente una osteoblastogénesis disminuida. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas al comparar los grupos osteoporóticas y controles. Otros estudios han mostrado una relación entre los niveles de este factor y la presencia de osteoporosis, sin embargo, se debe considerar que el factor fue medido en suero.^(133, 134)

Por su parte, Dkk1 inhibe la vía Wnt, por tanto también puede modular el desarrollo óseo, por regulación directa de la actividad de los osteoblastos. En nuestro estudio, no observamos diferencias significativas en el nivel de Dkk1 en el grupo de osteoporóticas al compararlo con el grupo control, pero hay que tener en cuenta la variabilidad individual que puede tener la producción de este factor.

Un estudio donde se analizó la concentración de Dkk1 y su relación con el metabolismo óseo y enfermedad aterosclerótica en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, observaron una correlación positiva entre Dkk-1 y DMO lumbar; pero no se encontraron diferencias en función del diagnóstico de osteoporosis o presencia de

fracturas vertebrales morfométricas⁽¹³⁵⁾, sin embargo no reportan el valor de Dkk-1 y además son valores circulantes.

Tian et al. (2015) estudiaron la asociación de los niveles séricos de Dkk-1 en mujeres osteoporóticas postmenopáusicas y controles sanos, sus resultados arrojaron que los niveles séricos de Dkk-1 en el grupo de osteoporóticas fue significativamente mayor al compararlo con el grupo control, sin embargo, se debe considerar que a diferencia de nuestro estudio, los valores son en plasma.⁽¹³⁶⁾

Distintos factores contribuyen a determinar lo que se conoce como microambiente regulador de la célula en la médula ósea. Dada la dificultad de conocer in situ el microambiente, los resultados obtenidos demuestran que la medición en el fluido puede ser una buena aproximación para encontrar diferencias por ejemplo entre osteoporóticas y controles. La concentración de factores en este fluido, sería diferente a la concentración de éstos en el plasma.

Conclusiones

Mujeres osteoporóticas tienen menor peso, masa muscular y porcentaje de grasa que las mujeres controles, lo que concuerda con lo reportado anteriormente por otros autores.

Las concentraciones de BMP-2 e irisina son significativamente más altas en muestras controles que en muestras osteoporóticas.

La medición de Dkk-1 no fue diferente en controles y osteoporóticas, sin embargo ésta muestra una gran variabilidad individual.

Estudios anteriores no han podido dilucidar la relación entre irisina y masa magra, en nuestro estudio observamos que la concentración de irisina en FMO no depende del índice de masa muscular, sino más bien de la DMO de las donantes.

La medición en el FMO de los factores reguladores de la actividad de células reflejaría la actividad en ese microambiente.

Las mediciones en FMO realizadas en nuestro trabajo reflejan un microambiente diferente al que se determina en el plasma.

En esta tesis demostramos que el ambiente regulador de factores importantes para la actividad de formación de hueso, es distinta en pacientes control y osteoporóticas.

Bibliografía

1. Lecanda F, Avioli LV, Cheng S-L. 1997. Regulation of bone matrix protein expression and induction of differentiation of human osteoblasts and human bone marrow stromal cells by bone morphogenetic protein-2. *J Cell Biochem* 67: 386-398.
2. Teitelbaum S. 2000. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289: 1504–1508.
3. American College of Obstetricians and Gynecologists. 2004. Osteoporosis. *Obstet Gynecol* 104: 66S-76S.
4. Connelly LB, Woolf A, Brooks P. 2006. Disease Control in Developing countries. Washington (DC): World Bank. Cost-Effectiveness of Interventions for Musculoskeletal Conditions.
5. Brotto M, Johnson ML. 2014. Bone and muscle endocrine crosstalk. *Current Osteoporosis Reports* 12: 135-141
6. Schoenau E, Neu MC, Beck B, et al. 2002. Bone mineral content per muscle cross-sectional area as an index of the functional muscle-bone unit. *J Bone Miner Res* 17: 1095-1101.
7. Burge R, Dawson-Hughes B, Solomon DH, et al. 2007. Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States, 2005-2025. *J Bone Miner* 22(3): 465–475.
8. Marks R. 2010. Hip fracture epidemiological trends, outcomes, and risk factors, 1970-2009. *Int J Gen Med* 3: 1–17.
9. Frisoli A Jr, Chaves PH, Ingham SJ, et al. 2011. Severe osteopenia and osteoporosis, sarcopenia, and frailty status in community-dwelling older women: results from the Women’s Health and Aging Study (WHAS) II. *Bone* 48(4): 952–957.
10. Di Monaco M, Vallero F, Di Monaco R, et al. 2011. Prevalence of sarcopenia and its association with osteoporosis in 313 older women following a hip fracture. *Arch Gerontol Geriatr* 52(1): 71–74.
11. Manolagas SC, Jilka RL. 1995. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. *N Engl J Med* 332: 305-311.
12. <http://escuela.med.puc.cl/publ/boletin/osteoporosis/epidemiologiaosteoporosis.html#>

13. Rodriguez JA, Valdivia G, Trincado P. 2007. Vertebral fractures, osteoporosis and vitamina D levels in Chilean postmenopausal women. *Rev Med Chile* 135: 31 – 36.
14. Arriagada M. 2009. Epidemiología de la osteoporosis en Chile. Fundación de Osteoporosis de Chile FUNDOP. Comunicación Congreso 8° SIBOMM/3° BRADOO
15. Lunsday R, Thome J. 1990. Estrogen treatment of patients with established postmenopausal osteoporosis. *Obstet-Gynecol* 76: 290-295.
16. Rosenberg IH. 1997. Sarcopenia: origins and clinical relevance. *J Nutr* 127(5): 990S-991S.
17. Brink W. 2007. Preventing Sarcopenia. *LifeExtension Magazine*.
18. Baumgartner RN, Koehler KM, Gallagher D, et al. 1998. Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico. *Am J Epidemiol* 147(8): 755-763.
19. Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, et al. 2010. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European working group on sarcopenia in older people. *Age Ageing* 39(4): 412-423.
20. Lera L, Ángel B, Sánchez H, et al. 2015. Estimación y validación de puntos de corte de índice de masa muscular esquelética para la identificación de sarcopenia en adultos mayores chilenos. *Nutr Hosp* 31(3): 1187 – 1197.
21. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. 1997. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells Turing extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 64(2): 278-294.
22. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284(5411): 143-147.
23. Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Jiang Y, et al. 2003. Neural differentiation and incorporation of bone marrow-derived multipotent adult progenitor cells alter single cell transplantation into blastocyst stage Mouse embryos. *Cell Transplant* 12(3): 201-213.
24. Song L, Webb NE, Song Y et al. 2006. Identification and functional análisis of candidate genes regulating mesenchymal stem cell self-renewal and multipotency. *Stem Cells* 24(7): 1707-1718.

25. Hirao A, Arai F, Suda T. 2004. Regulation of cell cycle in hematopoietic stem cells by de niche. *Cell Cycle* 3(12): 1481-1483.
26. Fuchs E, Tumber T, Guasch G. 2004. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 116(6): 769-778.
27. He S, Nakada D, Morrison SJ. 2009. Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25: 377-406.
28. Schofield R. 1978. The relationship between the spleen colony-forming cell and the aemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4(1-2): 7-25.
29. Zipori D. 2006. The stem state: mesenchymal plasticity as a paradigm. *Curr Stem Cell Res Ther* 1: 95-102.
30. Minguell JJ, Erices A, Conget P. 2001. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywoos)* 226(6): 507-520.
31. Roelen BA, Dijke PT. 2003. Controlling mesenchymal stem cell differentiation by TGFBeta family members. *J Orthp Sci* 8(5): 740-748.
32. Kortesisidis A, Zannettino A, Isenmann S, et al. 2005. Stromal-derived factor-1 promotes the growth, survival, and development of human bone marrow stromal stem cells. *Blood* 105(10): 3793-3801.
33. Baksh D, Song L, Tuan RS. 2004. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* 8(3): 301-316.
34. Meunier P, Aaron J, Edouard C, et al. 1971. Osteoporosis and the replacement of cell populations of the marrow by adipose tissue. A quantitative study of 84 iliac bone biopsies. *Clin Orthop Relat Res* 80: 147-154.
35. Ogawa S, Urano T, Hosoi T, et al. 1999. Association of bone mineral density with a polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene: PPARgamma expression in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 260: 122-126.
36. Bodine PV, Zhao W, Kharode YP, et al. 2004. The Wnt antagonist secreted frizzled related protein-1 is a negative regulator of trabecular bone formation in adult mice. *Mol Endocrinol* 18: 1222-1237.
37. Bennett CN, Longo KA, Wright WS, et al. 2005. Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt1Ob. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 3324-3329.

38. Bennett JH, Joyner, CJ, Triffitt JT, et al. 1991. Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential. *J Cell Sci* 99: 131-139.
39. Ji X, Chen D, Xu C, et al. 2000. Patterns of gene expression associated with BMP-2-induced osteoblast and adipocyte differentiation of mesenchymal progenitor cell 3T3-F442A. *J Bone Miner Metab* 18: 132-139.
40. Bonewald LF, Kiel DP, Clemens TL, et al. 2013. Forum on bone and skeletal muscle interactions: summary of the proceedings of an ASBMR workshop. *J Bone Miner Res* 28: 1857-1865.
41. Verschueren S, Gielen E, O'Neill TW, et al. 2013. Sarcopenia and its relationship with bone mineral density in middle-aged and elderly European men. *Osteop Int* 24: 87-98.
42. Ducher G, Bass SL, Saxon L, et al. 2011. Effects of repetitive loading on the growth-induced changes in bone mass and cortical bone geometry: a 12-month study in pre/peri and postmenarcheal tennis players. *J Bone Miner Res* 26: 1321-1329.
43. Kaji H. 2013. Linkage between muscle and bone: common catabolic signals resulting in osteoporosis and sarcopenia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 16: 272-277.
44. Glass GE, Chan JK, Freidin A, et al. 2011. TNF-alpha promotes fracture repair by augmenting the recruitment and differentiation of muscle-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 1585-1590
45. Henrotin Y. 2011. Muscle: a source of progenitor cells for bone fracture healing. *BMC Med* 9: 136-137
46. Kuhn NZ, Tuan RS. 2010. Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: implications in tumorigenesis and metastasis. *J Cell Physiol* 222: 268-277.
47. McBride SH, Falls T, Knothe Tate ML. 2008. Modulation of stem cell shape and fate B: mechanical modulation of cell shape and gene expression. *Tissue Eng Part A* 14: 1573-1580.
48. Seebach C, Henrich D, Tewksbury R, et al. 2007. Number and proliferative capacity of human mesenchymal stem cells are modulated positively in multiple trauma patients and negatively in atrophic nonunions. *Calcif Tissue Int* 80: 294-300.

49. Neumann K, Endres M, Ringe J, et al. 2007. BMP7 promotes adipogenic but not osteo-chondrogenic differentiation of adult human bone marrow-derived stem cells in high-density micro-mass culture. *J. Cell. Biochem* 102: 626 – 637.
50. Maliakal JC, Asahina I, Hauschka PV, et al. 1994. Osteogenic protein-1 (BMP-7) inhibits cell proliferation and stimulates the expression of markers characteristic of osteoblast phenotype in rat osteosarcoma (17/2.8) cells. *Growth Factors* 11: 227 – 234.
51. Lavery KS, Swain PM, Falb D, et al. 2008. BMP-2/4 and BMP-6/7 differentially utilize cell surface receptors to induce osteoblastic differentiation of human bone marrow derived mesenchymal stem cells. *J. Biol Chem* 283: 20948 – 20958.
52. Asahina I, Sampath TK, Hauschka PV. 1996. Human osteogenic protein-1 induces chondroblastic, osteo- blastic, and/or adipocytic differentiation of clonal murine target cells. *Exp Cell Res* 222: 38 – 47.
53. Bowers RR, Lane MD. 2007. A role for bone morphogenetic protein-4 in adipocyte development. *Cell Cycle* 6: 385 – 389.
54. Date T, Doiguchi Y, Nobuta M, et al. 2004. Bone morphogenetic protein-2 induces differentiation of multipotent C3H10T1/2 cells into osteoblasts, chondrocytes, and adipocytes in vivo and in vitro. *J Orthop Sci* 9: 503 – 508.
55. Friedman MS, Long MW, Hankenson KD. 2006. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells is regulated by bone morphogenetic protein-6. *J Cell Biochem* 98: 538 – 554.
56. Riley EH, Lane JM, Urist MR, et al. 1996. Bone morphogenetic protein 2. Biology and applications. *Clin Orthop* 324: 39-46.
57. Xu XL, Lou J, Tang T, 2005. Evaluation of different scaffolds for BMP-2 genetic orthopedic tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 75(2): 289-303.
58. Katagiri T, Imada M, Yanai T, et al. 2002. Identification of a BMP-responsive element in ID1, the gene for inhibition of myogenesis. *Genes Cells* 7(9): 949-960.
59. Luu HH, Song WX, Luo, X, et al. 2007. Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of Orthop Res* 25: 665-677.
60. Musgrave DS, Bosch P, Ghivizzani S, et al. 1999. Adenovirus-mediated direct gene therapy with bone morphogenetic protein-2 produces bone. *Bone* 24: 541-547.

61. Luo Q, Kang Q, Si W, et al. 2004. Connective tissue growth factor (CTGF) is regulated by wnt and bone morphogenetic proteins signaling in osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *J Biol Chem* 279: 55958-55968.
62. Peng Y, Kang Q, Cheng H, et al. 2003. Transcriptional characterization of bone morphogenetic proteins (BMPs)-mediated osteogenic signaling. *J Cell Biochem* 90: 1149-1165.
63. Peng Y, Kang Q, Luo Q, et al. 2004. Inhibitor of DNA binding/differentiation helix-loop-helix proteins mediate bone morphogenetic protein-induced osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *J Biol Chem* 279: 32941-32949.
64. Chen D, Zhao M, Mundy GR. 2004. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 22: 233 – 241.
65. Miyazono K, Maeda S, Imamura T. 2005. BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev* 16: 251 – 263.
66. Nohe A, Keating E, Knaus P, et al. 2004. Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell. Signal* 16: 291 – 299.
67. Chen D, Ji X, Harris MA, et al. 1998. Differential roles for bone morphogenetic protein (BMP) receptor type IB and IA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages. *J. Cell Biol* 142: 295 – 305.
68. Hata K, Nishimura R, Ikeda F, et al. 2003. Differential roles of Smad1 and p38 kinase in regulation of peroxisome proliferator-activating receptor gamma during bone morphogenetic protein 2-induced adipogenesis. *Mol Biol Cell* 14: 545 – 555.
69. Sottile V, Seuwen K. 2000. Bone morphogenetic protein-2 stimulates adipogenic differentiation of mesenchymal precursor cells in synergy with BRL 49653 (rosiglitazone). *FEBS Lett* 475: 201 – 204
70. Cheng H, Jiang W, Phillips FM, et al. 2003. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am* 85-A: 1544 – 1552.

71. Suzawa M, Takeuchi Y, Fukumoto S, et al. 1999. Extracellular matrix-associated bone morphogenetic proteins are essential for differentiation of murine osteoblastic cells in vitro. *Endocrinology* 140: 2125 – 2133.
72. Gazzo E, Smerdel-Ramoya A, Zanotti S, et al. 2007. Conditional deletion of gremlin causes a transient increase in bone formation and bone mass. *J. Biol Chem* 282: 31549– 31557.
73. Okamoto M, Murai J, Yoshikawa H, et al. 2006. Bone morphogenetic proteins in bone stimulate osteoclasts and osteoblasts during bone development. *J. Bone Miner Res* 21: 1022 – 1033.
74. Gazzo E, Pereira RC, Jorgetti V, et al. 2005. Skeletal overexpression of gremlin impairs bone formation and causes osteopenia. *Endocrinology* 146: 655 – 665.
75. Wu XB, Li Y, Schneider A, et al. 2003. Impaired osteoblastic differentiation, reduced bone formation, and severe osteoporosis in noggin- overexpressing mice. *J. Clin. Invest* 112: 924 – 934.
76. Devlin RD, Du Z, Pereira RC, et al. 2003. Skeletal overexpression of noggin results in osteopenia and reduced bone formation. *Endocrinology* 144: 1972 – 1978.
77. Mishina Y, Starbuck MW, Gentile MA, et al. 2004. Bone morphogenetic protein type IA receptor signaling regulates postnatal osteoblast function and bone remodeling. *J Biol Chem* 279: 27560 – 27566.
78. Zhang Z, Song Y, Zhang X, et al. 2003. Msx1/Bmp4 genetic pathway regulates mammalian alveolar bone formation via induction of Dlx5 and Cbfa1. *Mech Dev* 120: 1469 – 1479.
79. Bonewald LF, Kiel DP, Clemens TL, et al. 2013. Forum on bone and skeletal muscle interactions: summary of the proceedings of an ASBMR workshop. *J Bone Miner Res* 28: 1857-1865.
80. Bennett CN, Longo KA, Wright WS, et al. 2005. Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 3324-3329.
81. Qiu W, Andresen TE, Bollerslev J, et al. 2007. Patients with high bone mass phenotype exhibit enhanced osteoblast differentiation and inhibition of adipogenesis of human mesenchymal stem cells. *J Bone Min Res* 22: 1720-1731.

82. MacDonald BT, Tamai K, He X. 2009. Wnt/Beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 17: 9–26.
83. Rawadi G, Vayssiere B, Dunn F, et al. 2003. BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *J Bone Miner Res* 18: 1842-1853.
84. Kang S, Bajnok L, Longo KA, et al. 2005. Effects of Wnt signaling on brown adipocyte differentiation and metabolism mediated by PGC-1alpha. *Mol Cell Biol* 25: 1272–1282.
85. Bennett CN, Ross SE, Longo KA, et al. 2002. Regulation of Wnt signaling during adipogenesis. *J Biol Chem* 277: 30998–31004.
86. Wright WS, Longo KA, Dolinsky VW, et al. 2007. Wnt10b inhibits obesity in ob/ob and agouti mice. *Diabetes* 56: 295–303.
87. Longo KA, Wright WS, Kang S, et al. 2004. Wnt10b inhibits development of white and brown adipose tissues. *J Biol Chem* 279: 35503–35509.
88. Bennett CN, Longo KA, Wright WS, et al. 2005. Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 3324–3329.
89. Bennett CN, Ouyang H, Ma YL, et al. 2007. Wnt10b increases postnatal bone formation by enhancing osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res* 22: 1924–1932.
90. Kang S, Bennett CN, Gerin I, et al. 2007. Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* 282: 14515–14524.
91. Deal C. 2009. Potential new drug targets for osteoporosis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 5(1): 20-27
92. Ross SE, Hemati N, Longo KA, et al. 2000. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science* 289: 950–953.
93. Cawthorn WP, Heyd F, Hegyi K, et al. 2007. Tumor necrosis factor-alpha inhibits adipogenesis via a beta-catenin/TCF4 (TCF7L2)-dependent pathway. *Cell Death Differ* 14: 1361–1373.
94. Bafico A, Liu GZ, Yaniv A, et al. 2001. Novel mechanism of Wnt xpressio inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/ Arrow. *Nat Cell Biol* 3: 683–686.

95. Chu EY, Hens J, Andl T, et al. 2004. Canonical WNT signaling promotes mammary placode development and is essential for initiation of mammary gland morphogenesis. *Development* 131: 4819–4829.
96. Davidson G, Mao BY, Barrantes ID, et al. 2002. Kremen proteins interact with Dickkopf1 to regulate anteroposterior CNS patterning. *Development* 129: 5587–5596.
97. Gregory CA, Singh H, Perry AS, et al. 2003. The Wnt signaling inhibitor dickkopf-1 is required for reentry into the cell cycle of human adult stem cells from bone marrow. *J Biol Chem* 278: 28067–28078.
98. Kuhnert F, Davis CR, Wang HT, et al. 2004. Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 266–271.
99. Mao BY, Wu W, Davidson G, et al. 2002. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin expression. *Nature* 417: 664–667.
100. Mao BY, Niehrs C. 2003. Kremen2 modulates Dickkopf2 activity during Wnt/ LRP6 signaling. *Gene* 302: 179–183.
101. Semenov MV, Tamai K, Brott BK, et al. 2001. Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr Biol* 11: 951–961.
102. Niehrs C. 2006. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene* 25: 7469–7481.
103. Bafico A, Liu G, Yaniv A, et al. 2001. Novel mechanism of Wnt expression inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat Cell Biol* 3: 683–686.
104. Christodoulides C, Lagathu C, Sethi JK, et al. 2009. Adipogenesis and Wnt signalling. *Trends Endocrinol Metab* 20(1): 16–24.
105. Li J, Sarosi I, Cattley RC, et al. 2006. Dkk1-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia. *Bone* 39: 754–766.
106. Guo J, Liu M, Yang D, et al. 2010. Suppression of Wnt signaling by Dkk1 attenuates PTH-mediated stromal cell response and new bone formation. *Cell Metab* 11: 161–171.

107. Qiang YW, Barlogie B, Rudikoff S, et al. 2008. Dkk1-induced inhibition of Wnt signaling in osteoblast differentiation is an underlying mechanism of bone loss in multiple myeloma. *Bone* 42: 669–680.
108. Morvan F, Boulukos K, Clement-Lacroix P, et al. 2006. Deletion of a single allele of the Dkk1 gene leads to an increase in bone formation and bone mass. *J Bone Miner Res* 21: 934–945.
109. Tian E, Zhan FH, Walker R, et al. 2003. The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N Engl J Med* 349: 2483–2494.
110. Zhang J, Cheng J, Tu Q, et al. Effects of irisin on bone metabolism and its signal mechanism. ASBMR 2013 Annual Meeting; 2013 October 4-7; Baltimore Convention Center. Baltimore, MD: American Society for Bone and Mineral Research.
111. Roca-Rivada A, Castelao C, Senin LL, et al. 2013. Irisin is not only a myokine but also an adipokine. *PLoS ONE* 8, e60563.
112. Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, et al. 2012. APOC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* 481: 463-468.
113. Colaianni, G., Cuscito, C., Mongelli, T. et al. 2014. Irisin enhances osteoblast differentiation in vitro. *Int J Endocrinol* 902186.
114. Anastasilakis AD, Polyzos SA, Makras P. et al. 2014. Circulating irisin is associated with osteoporotic fractures in postmenopausal women with low bone mass but is not affected by either teriparatide or denosumab treatment for 3 months. *Osteop Int* 25: 1633–1642.
115. Palermo A, Strollo R, Maddaloni E, et al. 2015. Irisin is associated with osteoporotic fractures independently of bone mineral density, body composition or daily physical activity. *Clinical Endocrinology* 82: 615-619.
116. Pino AM, Ríos S, Astudillo P, et al. 2010. Concentration of adipogenic and proinflammatory cytokines in the bone marrow supernatant fluid of osteoporotic women. *J Bone Mineral Research* 25(3): 492-498.
117. Miranda M, Pino AM, Fuenzalida K, et al. 2016. Characterization of fatty acid composition in bone marrow fluid from postmenopausal women: modification after hip fracture. *J Cell Biochem* 117: 2370-2376.

118. Rodríguez JP, Garat S, Gajardo H, et al. 1999. Abnormal osteogenesis in osteoporotic patients is reflected by altered mesenchymal stem cell dynamics. *J Cell Biochem* 75: 414– 423.
119. Raisz LG. 1997. The osteoporosis revolution. *Ann Intern Med* 126: 458–462.
120. Wiig H, Berggreen E, Borge BA, et al. 2004. Demonstration of altered signaling responses in bone marrow extracellular fluid during increased hematopoiesis in rats using a centrifugation method. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H2028–H2034.
121. Asomaning K, Bertone-Johnson ER, Nasca PC, et al. 2006. The association between body mass index and osteoporosis in patients referred for a bone mineral density examination. *J Womens Health (Larchmt)*; 15(9): 1028 – 1034.
122. Ceinos Arcones M, Acosta Estévez E, Martín Perpiñán C, et al. 1999. Risk factors relating to osteoporosis and the age at which the menopause appears in the general population. *Atención Primaria* 24(3): 140 – 144.
123. Hsu Y-H, Venners SA, Terwedow HA, et al. 2006. Relation of body composition, fat mass, and serum lipids to osteoporotic fractures and bone mineral density in Chinese men and women. *Am J Clin Nutr* 83(1): 146-154.
124. Greco EA, Fornari R, Rossi F, et al. 2010. Is obesity protective for osteoporosis? Evaluation of bone mineral density in individuals with high body mass index. *Int J Clin Pract* 64(6): 817-820.
125. Genaro PS, Pereira GA, Pinheiro MM, et al. 2010. Influence of body composition on bone mass in postmenopausal osteoporotic women. *Arch Gerontol Geriatr* 51(3): 295-298.
126. Miyakoshi N, Hongo M, Mizutani Y, et al. 2013. Prevalence of sarcopenia in Japanese women with osteopenia and osteoporosis. *J Bone Miner Metab* 31: 556-561.
127. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, et al. 2003. Osteoblastic cells regulate the hematopoietic stem cell niche. *Nature* 425: 841-846.
128. Chen D, Ji X, Harris MA, et al. 1998. Differential roles for bone morphogenetic protein (BMP) receptor type IB and IA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages. *J Cell Biol* 142(1): 295-305.

130. Anastasilakis AD, Polyzos SA, Makras P, et al. 2014. Circulating irisin is associated with osteoporotic fractures in postmenopausal women with low bone mass but is not affected by either teriparatide or denosumab treatment for 3 months. *Osteoporosis Int* 25(5): 1633-1642.
131. Albrecht E, Norheim F, Thiede B, et al. 2015. Irisin – a myth rather than an exercise – inducible myokine. *Nature* 5: 8889
132. Jedrychowski MP, Wrann CD, Paulo JA, et al. 2015. Detection and quantitation of circulating human irisin by tandem mass spectrometry. *Cell Metabolism* 22: 734-740.
133. D’Amelio P, Sassi F, Buondonno I, et al. 2015. Treatment with intermittent PTH increases Wnt10b production by T cells in osteoporotic patients. *Osteoporosis International* 26(12): 2785-2791.
134. Zhang J, Motyl KJ, Irwin R. 2015. Loss of bone and Wnt10b expression in male type 1 Diabetic mice is blocked by the probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Endocrinology* 156(9): 3169-3182.
135. Reyes-García R, Rozas-Moreno P, García-Martín A, et al. 2016. Serum dickkopf1 (DKK1), bone metabolism and atherosclerotic disease in patients with type 2 diabetes. *Rev Osteoporos Metab Miner* 8(1): 24-29.
136. Tian J, Xu XJ, Shen L, et al. 2015. Association of serum Dkk-1 levels with B-catenin in patients with postmenopausal osteoporosis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 35(2): 212-218.

Anexos

1. Consentimiento Informado



Universidad de Chile
Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos
(INTA)

Av. El Líbano 5524, Macul
www.inta.cl



CONSENTIMIENTO INFORMADO

LAS CELULAS MADRES DE LA MEDULA OSEA DE MUJERES
OSTEOPOROTICAS TIENEN DIFERENCIAS FUNCIONALES RESPECTO DE
LAS NORMALES.

INVESTIGADOR RESPONSABLE: JUAN PABLO RODRIGUEZ VIVES

Información sobre el estudio de investigación.

La osteoporosis es una enfermedad del hueso que produce fragilidad de éste y facilidad para sufrir fracturas. En este estudio se analizará la calidad funcional de las “células madre” que se encuentran en la médula ósea; se piensa que estas células tendrían alguna alteración en su función en las mujeres osteoporóticas. Durante la cirugía de cadera que Ud. requiere como parte de su tratamiento, se puede obtener una muestra de médula ósea. Este estudio se realizará en las células obtenidas desde esa muestra y mantenidas en cultivo en el laboratorio.

¿Cuál es el propósito del estudio?

Conocer si las “células madre” que se encuentran en la médula ósea son distintas entre mujeres con y sin osteoporosis.

¿Quién puede participar en este estudio?

Mujeres mayores de 64 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 puede contribuir al estudio de células de tejidos humanos. Al participar en el estudio colaboro 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 consiente se guardará la muestra de tejido. Si cambia de opinión y no quiere participar, la muestra será desechada de acuerdo a los procedimientos establecidos para ello.

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

a) Durante la cirugía se sacará una pequeña porción del tejido interno del hueso (médula), 20 ml (2 cucharadas). Esa muestra se llevará al Laboratorio de Biología Celular del INTA, lugar en el que se aislarán las células.

b) Luego de algunos días de la cirugía y en el momento que indique su médico tratante, usted será trasladada al Policlínico del INTA (bajo la responsabilidad del proyecto), para realizar un examen llamado densitometría ósea. Este examen permite saber si usted tiene o no osteoporosis; este examen no es molesto ni invasivo, y requiere de una radiación equivalente a la de una radiografía dental.

c) Se lo solicita que autorice utilizar una parte de la muestra de sangre que de todos modos se le tomará antes de la cirugía a la que usted será sometida como parte de su tratamiento. Esta muestra de sangre se utilizará para la medición de algunos indicadores relacionados con enfermedades del hueso.

¿Usarán información incluida en mi ficha clínica?

Sí, conoceremos los datos de los exámenes de rutina de sangre y de orina que son indicadores de la salud de los huesos.

¿La muestra obtenida será utilizada exclusivamente en este estudio?

Sí, la muestra de médula ósea será utilizada solamente en este estudio. Sin embargo, si Ud. lo autoriza, las células aisladas de esta muestra podrían usarse posteriormente para otros estudios relacionados con la actividad del hueso. Si Ud. no lo autoriza, las células serán descartadas después de finalizado este proyecto.

¿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. La densitometría no representa ninguna molestia adicional excepto el tiempo necesario para el examen y traslados (60 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 de este proyecto. Su identidad no será revelada.

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

Todos los exámenes indicados permitirán un mejor diagnóstico respecto a la salud de sus huesos. Los costos de los exámenes y del traslado hacia y desde el INTA son de cargo del proyecto.

¿En qué podría este estudio beneficiar a otros?

El estudio permitiría conocer mejor la osteoporosis y podría ayudar a diseñar nuevos tratamientos.

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

No sufrirá ningún daño.

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

No, 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 más acerca del estudio o para hacer llegar algún reclamo respecto al trato recibido?

Al investigador responsable: Juan Pablo Rodríguez V. (fono 978 1452, dirección Av. El Líbano 5524 Macul) y para realizar alguna consulta sobre mis derechos como sujeto participante en la investigación a Dr. Patricio Peirano, Secretario Permanente del Comité de Ética del INTA (fono 978 1447).

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

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

DECLARACION 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 _____

2. Acta de aprobación Comité de ética Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos



Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos

Avda. El Libano 5524, Macul, Casilla 138, Correo 11, Santiago - Chile
www.inta.cl



Universidad de Chile

Acta de Aprobación N° 14 Miércoles 11 de Julio de 2012

Asisten: Patricio Peirano Secretario Permanente (Médico Cirujano, Prof. Titular), Patricia Alday (Representante de la Comunidad), Hugo Sanchez (Médico Cirujano, Prof. Asistente), Erna Raimann (Médico Cirujano, Prof. Asociado), Mariana Cifuentes (Bioquímico, Prof. Asociado).

Preside: Prof. Patricio Peirano

Proyecto: "Functional alterations in IGF-1, BMP-2 and Wnt signaling are distinctive of mesenchymal stem cells (MSCs) from the bone marrow of osteoporotic women".

Investigador: Dr Juan Pablo Rodríguez.

Documentos revisados: Proyecto y consentimiento informado.

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

Sobre las bases de la información proporcionada en el texto (Copia en archivo) y de los antecedentes aportados personalmente por el investigador, el Comité de Ética estima que el estudio no significa para los sujetos involucrados un riesgo adicional al de la cirugía indicada, tampoco hay riesgos psíquico, social, legal o de otra naturaleza, propios de este tipo de investigación.

En la evaluación del proyecto el comité de ética del INTA consideró los siguientes fundamentos: el valor social del proyecto resulta de su aporte al conocimiento científico, relacionado con las propiedades de las células madre humana (de sujetos controles y osteoporóticas). El proyecto tiene validez científica, según se desprende del análisis del documento completo, incluyendo los antecedentes de los investigadores. En el diseño no hay discriminación arbitraria de participantes; los sujetos de estudio no experimentan un riesgo adicional al de la cirugía de cadera a la que de todos modos se someterían por indicación médica; en dicho procedimiento clínico se obtiene el tejido desde el cual se obtienen las células. Adicionalmente, se puede considerar como un beneficio para la voluntaria participante el acceso a una densitometría ósea, que permite un mejor diagnóstico de la enfermedad ósea.

Se estimó que el consentimiento expresa la información necesaria en un lenguaje claro, incluyendo la protección de los derechos de las personas al establecer la posibilidad de no participar, y de contactar a este Comité para consultas respecto a los derechos de participantes en estudios de investigación.

Teléfonos: INFORMACIONES: 978-1400; DIRECCIÓN: 978-1411; EXTENSIÓN: 978-1401; DOCENCIA: 978-1451;
CEDINTA: 978-1467; DIRECCIÓN DE NEGOCIOS: 978-1404; CONTABILIDAD: 978-1416 FAX: 221-4030

Finalmente, los miembros del Comité no tienen ninguna relación con el patrocinante, ni con el investigador, que pudiera ser motivo de conflicto de interés.

En virtud de tales consideraciones el Comité otorga la autorización correspondiente para la realización del estudio dentro de las especificaciones señaladas en el protocolo, que incluye el Proyecto de Investigación y el Consentimiento Informado.

Cualquiera modificación del protocolo debe ser autorizada por este Comité. Una vez finalizado el estudio, el comité deberá ser informado de los resultados de éste.

Atentamente,

Dr. PATRICIO PEIRANO
Secretario Permanente



3. Acta de aprobación Comité de ética Hospital Sótero del Río

SERVICIO DE SALUD METROPOLITANO SUR ORIENTE
HOSPITAL " DR. SOTERO DEL RIO "
COMITE DE EVALUACION ETICO-CIENTIFICO

ACTA DE APROBACIÓN

Miembros del Comité de Evaluación Ético Científico que participaron en la sesión del 14 de Junio 2012

Comité constituido en conformidad a la resolución exenta N°2886 del Servicio de Salud Metropolitano Sur Oriente de fecha de fecha 06 de Julio 2009

Dr. Patricio Michaud Ch, Presidente del Comité
Dr. Rafael Téllez T. Secretario
Sr Robert Davis. Psicólogo. Complejo Asistencial Dr Sótero del Río
Dra. María Inés Gómez , Medico. Hospital Padre Hurtado
Dr. Lorna Luco, Médico. Hospital Padre Hurtado
Dr Gonzalo Menchaca. Medico Peditra CASR
Sra. Edith Mora. Trabajador Social SSMSO

PROTOCOLO

Investigador Principal. Dr. Juan Pablo Rodríguez V

Coinvestigadora: Dra. Ana María Pino Zúñiga

Universidad de Chile Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos

Colaborador Local: Dr. Germán Seitz

Este informe se refiere a la revisión que dos miembros del Comité hicieron de los siguientes documentos:

- 1: "FUNCTIONAL ALTERATIONS IN IGF-1, BMP-2 AND WNT SIGNALING ARE DISTINCTIVE OF MESENCHYMAL STEM CELLS (MSCs) FROM THE BONE MARROW OF OSTEOPOROTIC WOMEN"**
- 2- Formulario de Información al Paciente y consentimiento Informado**

Se evaluaron los siguientes requisitos Éticos

- 1. Valor Social:** SE trata de la continuación de una línea de investigación, con protocolo ya aprobados por este Comité y que aportaría información importante sobre el funcionamiento de células progenitoras en medula ósea de mujeres osteoporóticas
- 2. Valides Científica:** No hay observaciones.
- 3. Discriminación arbitraria de los participantes:** No hay, se hará en pacientes que por indicación médica van a ser sometidos a cirugía de caderas.
- 4. Razón riesgo / beneficio.** No hay riesgos, mayores. Ya que el procedimiento no implica riesgos en una paciente que esta siendo sometida a cirugía de cadera en la cual lo único que se hará será tomar una muestra de medula asea en el sitio quirúrgico. No implica ningún costo para la Institución

SERVICIO DE SALUD METROPOLITANO SUR ORIENTE
HOSPITAL " DR. SOTERO DEL RIO "
COMITE DE EVALUACION ETICO-CIENTIFICO

5. No se señalan **conflictos de interés**, los miembros del Comité no tienen ninguna relación ni con el patrocinante, ni con el investigador que pudiera ser motivo de conflicto de interés
6. **Consentimiento informado:** Se considera que el consentimiento comprende todo lo necesario en él, se aceptaron sugerencias de este Comité
7. **-Protección de los derechos de las personas:** Se considera la posibilidad de no participar

CONCLUSIÓN: Teniendo presente lo adecuado del diseño y la ausencia de objeciones éticas este Comité considera que no hay objeciones para solicitar a la autoridad administrativa local, la aprobación para realizar este estudio en sus dependencias

Le solicitamos: 1) Usar para el consentimiento informado fotocopias del que se adjunta validado por este Comité 2) Conservar toda la documentación en su poder por lo menos hasta tres años cerrado el estudio. 3) Informar a lo menos una vez al año de su marcha, como también de cualquier publicación o presentación a congresos que de él se generen. 4) La validez de esta aprobación es por un año, por lo que solicitamos se nos informe cuando se inicie el proyecto.



Dr. Patricio Michaud Ch.
Presidente
Comité de Evaluación Ético Científico
Servicio de Salud Metropolitano Sur Oriente

Cc Dirección Dirección Complejo
Archivo



4. Acta Confirmación de aprobación del Comité de ética Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos



Santiago 14 de Diciembre de 2016

Dr. Juan Pablo Rodríguez V.
INTA

Estimado Dr. Rodríguez el comité de ética se ha informado y registra que la tesis de la Sra. Natalia Flores B, alumna del programa de magister en Nutrición y Alimentos, titulada "Determinación de BMP-2, Wnt 10b, Dkk-1 e irisina en el fluido de médula ósea de mujeres postmenopáusicas y su relación con la densidad mineral ósea, masa magra y masa corporal", se realizó de acuerdo al protocolo y consentimiento informado del proyecto FONDECYT N° 1130045. La aprobación de dicho proyecto por este comité corresponde al Acta N° 14 del 11 de julio del 2012.

Saluda a usted atentamente,

Ana María Pino Z
Presidenta del Comité de Ética del INTA

