

UCh - FIC
Biotecnología
R696
C1

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**"EFECTO DE LEPTINA SOBRE LA ENZIMA AROMATASA DE CÉLULAS
TRONCALES MESENQUIMÁTICAS (MSCS) DE MEDULA ÓSEA HUMANA"**

Memoria de Título

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular



por

Juan Manuel Rodríguez Silva.

Diciembre, 2006
Santiago - Chile

Director de Memoria de Título: Dr. Juan Pablo Rodríguez Vives.

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
MEMORIA DE TITULO

Se informa a la Escuela de Ciencias de la Facultad de Ciencias que la Memoria de Título presentada por el candidato.

NOMBRES Y APELLIDOS

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Memoria de Título como requisito para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular, en el examen de Defensa de la Memoria rendido el día---, de mes de año

Director de Memoria de Título:

Dr. Juan Pablo Rodríguez Vives



Comisión de Evaluación de la Memoria de Titulo

Dr. Christian González B.

Dra. Veronica Palma A.



Al final de este largo camino no me queda mas que agradecer a mi familia por haberme aguantado todo este tiempo y en éspecial a McHaby, ese sentimiento que nos mantuvo vivos por este largo tiempo, que solo nos lleno de felicidad y triunfos.





ÍNDICE DE CONTENIDO

Portada	i
Índice de contenido	iii
Índice de tablas	iv
Índice de figuras	v
Lista de abreviaturas	vii
Resumen	ix
Abstract	xi
Introducción	1
Hipótesis	12
Materiales y métodos	14
Resultados	26
Discusión	48
Conclusión	60
Bibliografía	61

ÍNDICE DE TABLAS



Tabla 1: Tabla de diagnóstico de osteoporosis.	16
Tabla 2: Características de las donantes utilizadas en esta tesis.	26

ÍNDICE DE FIGURAS



Figura 1: Diagrama de formación y resorción ósea.	2
Figura 2: Diferenciación de las MSC's.	4
Figura 3: Reacción de la enzima aromatasa.	7
Figura 4: Actividad aromatasa bajo estímulo osteogénico y adipogénico.	29
Figura 5: Actividad aromatasa bajo estímulo osteogénico a diferentes concentraciones de leptina.	31
Figura 6: Actividad aromatasa bajo estímulo de leptina.	32
Figura 7: Actividad aromatasa bajo estímulo de Vitamina D.	33
Figura 8: Inmunofluorescencia de MSC's para enzima aromatasa.	35
Figura 9: Western blot de MSC's para enzima aromatasa.	36
Figura 10: Efecto de PD98059.	38
Figura 11: Western blot de MSC's para enzima aromatasa con inhibidor PD98059.	39
Figura 12: Actividad aromatasa en MSC's de donantes normales y osteoporóticas bajo estímulo osteogénico.	42
Figura 13: Actividad aromatasa en MSC's de donantes normales y osteoporóticas bajo estímulo adipogénico.	43
Figura 14: Actividad aromatasa en MSC's de donantes normales y osteoporóticas bajo estímulo por 24 horas de diferenciación osteogénico y adipogénico.	44
Figura 15: Efecto de leptina en células de donantes normales y	

osteoporóticas.	45
Figura 16: Efecto de vitamina D en células de donantes normales y osteoporóticas.	47
Figura 17: Modelo de acción de leptina en las MSC's	58



LISTA DE ABREVIATURAS

MSC's:	Mesenchymal stem cells.
MAPK:	Mitogen activated protein kinase.
C ₁₉ :	Compuestos de 19 carbonos.
GH:	Hormona de crecimiento.
PTH:	Hormona paratiroidea.
BMP's:	Proteínas morfogénicas del hueso.
IGF-I:	Insulin-like growth factor 1.
IGF-II:	Insulin-like growth factor 2.
FGF:	Fibroblast growth factor.
IL-1:	Interleuquina 1.
IL-6:	Interleuquina 6.
kDa:	Kilo Dalton.
C-terminal:	Extremo carboxilo terminal.
OB-R:	Receptor de leptina.
PPAR γ :	Peroxisome proliferator-activated receptor.
DMO:	Densidad mineral ósea.
DS:	Desviación estándar.
DMEM:	Dulbecco's Minimal Essential Medium.
SF:	Suero fetal bovino.
rpm:	Revoluciones por minuto.
DMSO:	Dimetilsulfóxido.

OS:	Medio de diferenciación osteogénico.
PBS:	Buffer fosfato salino.
AD:	Medio de diferenciación adipogénico.
IBMX:	Isobutilmetilxantina.
TCA:	Tricloroacético.
BSA:	Albúmina sérica de bovino.
TBS:	Buffer tris salino.
FITC:	Fluorescein isothiocyanate.
PAGE:	Electroforesis en geles de poliacrilamida.
HEPES:	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid.
PMSF:	p-metilsulfonifluoruro.
SDS:	Dodecilsulfato de sodio.
VHS:	Velocidad de sedimentación.
GOT:	Transaminasa glutámico oxaloacético.
GPT:	Transaminasa glutámico pirúvico.
TSH:	Hormona estimulante de la tiroide.
TNF:	Tumor necrosis factor.
IL-7:	Interleuquina 7.
SVHFO:	Línea celular de ovario fetal humano.

RESUMEN

La osteoporosis postmenopáusicas es una de las patologías más importantes en Chile y en el mundo, que se caracteriza por una disminución de la masa ósea. La disminución de la masa ósea es producto de un desbalance entre la formación y la resorción del hueso. Los procesos de formación y resorción ósea son regulados por factores locales y sistémicos tales como hormonas, factores de crecimiento y citoquinas. Se ha observado que en la osteoporosis postmenopáusicas se produce un aumento de los adipocitos en la médula ósea en desmedro de las células osteogénicas. Ya que los osteoblastos y adipocitos derivan de un precursor común, las MSC's, se ha propuesto la "teoría lipídica de la osteoporosis" para explicar la patogénesis de esta enfermedad. Esta teoría propone que en la osteoporosis ocurriría una disminución de la formación de células osteogénicas en la médula ósea debido a un aumento de tejido adiposo. Se sabe que numerosos factores están involucrados en la regulación de la proliferación y diferenciación de las células progenitoras hacia los fenotipos osteogénicos y/o adipogénicos. Uno de los factores propuestos para explicar el desbalance entre la osteogénesis y la adipogénesis es el estrógeno. La deficiencia de estrógeno se asocia con una disminución del tejido óseo y un aumento de los adipocitos en la médula ósea. Se sabe que los estrógenos producidos a nivel local en el hueso, son importantes en la regulación de la homeostasis de este tejido, lo que sugiere que la acción local de la enzima aromatasa estaría jugando un rol fundamental en la síntesis de estrógeno a nivel local. Por otra parte, diversos estudios clínicos demuestran que existe una estrecha

relación entre masa ósea y contenido graso. Así, se ha observado que entre los muchos factores asociados con la osteoporosis el sobrepeso es relevante. De hecho, se ha visto que mujeres con exceso de peso se encuentran más protegidas contra la osteoporosis postmenopáusica que aquellas mujeres de peso normal o bajo peso. Se ha propuesto a la leptina como candidata para explicar la protección que tienen las mujeres obesas ante la osteoporosis. Todos estos hallazgos conllevan a que sea de gran importancia analizar la actividad aromatasa en MSC's y la influencia que pueda tener leptina en esta actividad. Además, es interesante observar como influyen otros compuestos osteogénicos tales como la vitamina D; ya que la deficiencia de esta vitamina es un factor de riesgo importante en la pérdida de masa ósea. El objetivo fue analizar si leptina ejerce un rol protector del tejido óseo a través de una acción directa sobre las MSC's y si este efecto sería a través del efecto que leptina pudiera tener sobre la actividad de la enzima aromatasa en las MSC's. En esta trabajo, demostramos que MSC's aisladas desde muestras de médula ósea presentaban actividad aromatasa y que ésta aumentaba en condiciones de diferenciación osteogénica o adipogénica. También, se demostró que la leptina y vitamina D producen un aumento de la actividad aromatasa al agregarlas junto con el medio de diferenciación osteogénico. Además, demostramos que la actividad aromatasa es mayor en MSC's de donantes normales que en MSC's de donantes osteoporóticas. Con estos resultados concluimos que el rol protector de leptina se puede explicar en parte por el aumento que produce en la actividad aromatasa.

ABSTRACT

The postmenopausal osteoporosis is one of the most important diseases in Chile and the world; it is characterized by a diminution of bone mass. The decrease of bone mass is produced by an unbalance between bone formation and resorption. Bone formation and resorption process are regulated by local and systemic factors such as hormones, growth factors and cytokines. In the postmenopausal osteoporosis, an increase of adipocyte together a diminution of osteogenic cells in the bone marrow is observed. Since, as osteoblasts and adipocytes derived from a common precursor, the mesenchymal stem cells, it has been proposed the called "lipidic theory of osteoporosis" to explain the pathogenesis of the disease. This theory proposes that, in osteoporosis occurs a diminution in the formation of osteogenic cells in bone marrow due to an increase of adipose tissue. It is known that many factors, including transcription factors, are involved in the regulation of proliferation and differentiation of progenitor cells towards the osteogenic and/or adipogenic phenotypes. Estrogen is one of the factors proposal to explain this unbalance between osteogenesis and adipogenesis. Estrogen deficiency is associated with bone tissue diminution and an increase of adipocyte in bone marrow. It is known that estrogens produced at local level in bone are important in the regulation of homeostasis of this tissue; suggesting that the local action of the aromatase enzyme is playing an important role in the syntesis of estrogen at local level. In other way, many clinical studies have demonstrated the existence of a close relationship between bone mass and fat contain. Therefore, it has been observed

that, among different factors associated with the osteoporosis, the overweight is relevant. In fact, it has been observed that women with overweight are less susceptible to suffer postmenopausal osteoporosis than women with normal or low weight. It has been proposed to leptin as a candidate to explain the protection effect that fat exerts to the osteoporosis. All the findings described above indicate the importance to analyze the aromatase activity in MSC's and the influence of leptin on this activity. In addition, it is interested to study how other osteogenic compounds, as vitamin D, influence the aromatase activity; since, the deficiency of this vitamin is an important risk factor on bone mass lost. The objective of this work was to analyze if leptin have a protector role of bone tissue, through a direct action on MSC's, and if this protector effect may be through increased the aromatase activity in MSC's. In this work, we demonstrated that MSC's isolated from bone marrow samples exhibit aromatase activity and that this activity increases in osteogenic and adipogenic differentiation conditions. Also, we demonstrated that leptin and vitamin D produce an increase of aromatase activity when they were added in conjunction with the osteogenic differentiation medium. In addition, we demonstrated that aromatase activity is higher in MSC's derived from normal donors than in MSC's obtained from osteoporotic donors. The results obtained in this thesis permit us to concluded that the protector role of leptin on bone tissue can be explain, in part, by the increase in the aromatase activity produced by this hormone in MSC's .

INTRODUCCIÓN

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

En condiciones normales existe un constante recambio del tejido óseo al igual que los otros tejidos del cuerpo (Figura 1). Mientras la formación del tejido óseo es producida por los osteoblastos, los cuales derivan de las células troncales mesenquimáticas (MSC's) presentes en la médula ósea y otros tejidos (Minguell y col, 2000), la resorción ósea es producida por la acción de los osteoclastos, que derivan de células troncales hematopoyéticas. Las MSC's son células multipotentes con capacidad para autorrenovarse y que se pueden diferenciar a distintos fenotipos celulares: osteoblastos, adipocitos, condrocitos, células de estroma de médula ósea,

entre otros los cuales dan origen a diferentes tejidos: hueso, tejido adiposo, cartílago, estroma de médula ósea, y otros tejidos conectivos (Caplan, 1991) (Figura 2). El proceso de diferenciación ocurre a través de diferentes etapas, durante las cuales se produce una pérdida creciente de la capacidad de diferenciación y un aumento del compromiso hacia los distintos linajes celulares.

Figura 1: Diagrama de formación y resorción ósea.

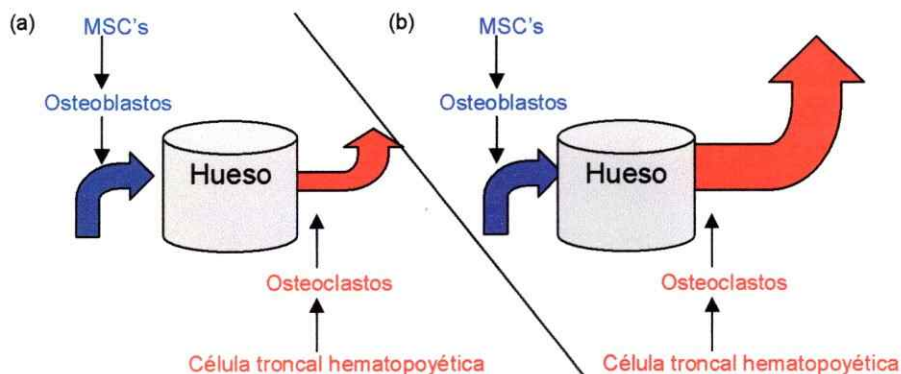


Figura 1: Diagrama de formación y resorción ósea en una persona normal (a) y en una persona osteoporótica.

La formación de hueso involucra la proliferación de células progenitoras multipotentes (MSC's), su diferenciación hacia células progenitoras osteogénicas, migración de estas células a la superficie del hueso y su diferenciación hacia osteoblastos. (Long y col, 1995; Lecanda y col, 1997). Los procesos de formación y resorción ósea son finamente regulados por factores locales y sistémicos (hormonas como GH, PTH, estrógenos, vitamina D; factores de crecimiento como BMP's (proteínas morfogénicas del hueso), IGF-I, IGF-II, FGF y citoquinas tales como IL-1,

IL-6, etc.), con el fin de mantener la masa ósea constante (Lecanda y col, 1997). Debido a que las células progenitoras del hueso presentes en la médula ósea poseen una gran plasticidad, se acepta cada vez más que cambios en ciertas propiedades funcionales de estas células, como por ejemplo su capacidad de diferenciación, podrían explicar los defectos en el balance de la masa ósea que se observan en ciertas patologías de los huesos. Hasta hace poco, sólo existían evidencias indirectas que sugerían que las alteraciones en la regulación de las diferentes vías de diferenciación de las MSC's podrían ser importantes en la génesis de algunos desórdenes óseos (Gimble y col, 1996; Nuttall y col, 1998). Pero, en los últimos años se ha planteado la "teoría lipídica de la osteoporosis" (Parhami y col, 1999). Esta teoría propone que, ya que las MSC's dan origen a los osteoblastos y poseen a su vez la capacidad de dar origen a adipocitos, en la osteoporosis estaría ocurriendo una disminución de la formación de células osteogénicas debido a un aumento de tejido adiposo en la médula ósea.

Figura 2: Diferenciación de las MSC's.

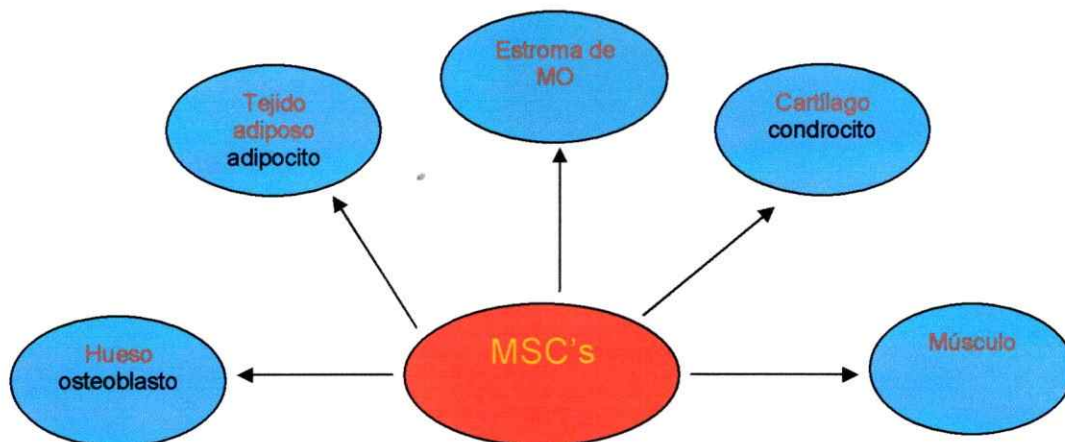


Figura 2: Capacidad de diferenciación de las MSC's, en color rojo el tejido al cual se diferencia y en color azul la célula resultante. MO: médula ósea.

Las primeras observaciones histomorfométricas sugieren que en la osteoporosis, el cambio de la dinámica de las células óseas es la consecuencia del reemplazo de la población de células funcionales de la médula ósea por tejido adiposo (Nuttall y col, 1998). Estudios clínicos posteriores mostraron que el aumento del tejido adiposo observado en la médula ósea de pacientes osteoporóticas se encuentra asociado con una disminución del número de células del linaje osteogénico. Este aumento en el número de adipocitos presentes en la médula ósea se ha observado en todas las condiciones que conducen a una pérdida de la masa ósea, tales como ovariectomía, inmovilización o tratamiento con glucocorticoides (Nuttall y col, 1998; Nuttall y Gimble, 2000). Esta característica del hueso osteoporótico ha sido avalada por observaciones clínicas que indican la existencia de una correlación entre la aparición de grasa en la médula ósea y una disminución de la capacidad de formar hueso, sugiriendo la existencia de una relación inversa

entre adipocitos y osteoblastos (Gimble y col, 1996). Ya que ambos, tanto los osteoblastos como los adipocitos, provienen de un precursor común y por ende pueden ser regulados en forma conjunta, los resultados anteriormente mencionados sugieren que, en la osteoporosis, el compromiso de las MSC's hacia la vía de diferenciación adipogénica estaría favoreciendo, en desmedro del compromiso hacia la vía osteogénica (Gimble y col, 1996; Parhami y col, 1999).

Resultados obtenidos en modelos apoyan los datos clínicos que muestran un aumento del tejido adiposo en la médula ósea de pacientes osteoporóticas. Así, resultados obtenidos en nuestro laboratorio (Rodríguez y col, 2000) muestran que MSC's obtenidas de pacientes osteoporóticas sintetizan una matriz extracelular deficiente en colágeno tipo I, lo cual favorece la diferenciación de estas células hacia el linaje adipogénico; sin embargo, hasta ahora no se conocen con exactitud los mecanismos celulares y moleculares que dan cuenta de este hecho. Por esta razón, es importante comprender los mecanismos y factores involucrados en el compromiso hacia los diferentes linajes y en la formación del fenotipo celular maduro, osteoblasto o adipocito para comprender la patogénesis de la enfermedad.

Se sabe que numerosos factores, incluyendo hormonas, factores de crecimiento, citoquinas y factores de transcripción, por nombrar algunos, están involucrados en la regulación de la proliferación y diferenciación de las células progenitoras hacia los fenotipos osteogénicos y/o adipogénicos. Dentro de estos, nos interesa estudiar el rol de dos factores que tienen una participación importante en el metabolismo óseo, como son los estrógenos y leptina (Thomas y col, 1999).

Así el estrógeno es uno de los factores propuestos para explicar el desbalance entre la osteogénesis y la adipogénesis. La deficiencia de estrógeno está asociada con la disminución ósea y el aumento de adipocitos en la médula ósea (Rickard y col, 1999; Nuttall y Gimble, 2000). Actualmente no se sabe como el estrógeno regularía la diferenciación osteogénica o adipogénica. Sin embargo estudios demuestran que el estrógeno inhibe la resorción ósea disminuyendo el número de osteoclastos presentes (Jilka y col, 1992). También existen muchas evidencias que demuestran que estrógeno, además de la osteogénesis, estaría afectando la adipogénesis. Además, en investigaciones realizadas en ratones deficientes en receptores de estrógeno se ha encontrado una mayor cantidad de tejido adiposo de lo normal (Olhsson y col, 2000).

A pesar de las evidencias mencionadas anteriormente, existen numerosos estudios que reportan que el estrógeno circulante no sería un factor importante en la mantención de la masa ósea (Nawata y col, 1995); sin embargo, se sabe que la aromatización a nivel local de precursores de estrógeno en células del hueso para la producción de estrógenos, sería importante en la regulación de la homeostasis ósea, lo que sugiere que la acción local de la enzima aromatasa, responsable de la aromatización, estaría jugando un rol fundamental en el nivel de estrógeno a nivel local (Tanaka y col, 1996).

La enzima aromatasa, producto del gen *cyp 19*, es la responsable de la producción de estrógenos, por medio de la aromatización de los esteroides C₁₉ (figura 3). Esta enzima, proveniente de la familia de las enzimas citocromo P450, está presente en diferentes tejidos tales como el tejido adiposo, mamario y óseo

entre otros (Means y col, 1989; Simpson, 2000). Así algunos estudios han reportado la presencia de actividad aromatasa en osteoblastos (Purohit y col, 1992; Tanaka y col, 1993) y en otros se ha reportado que ratones deficientes en la enzima aromatasa tendrían aumentada significativamente la cantidad de tejido adiposo intra-abdominal (Jones y col, 2001).

Figura 3: Reacción de la enzima aromatasa.

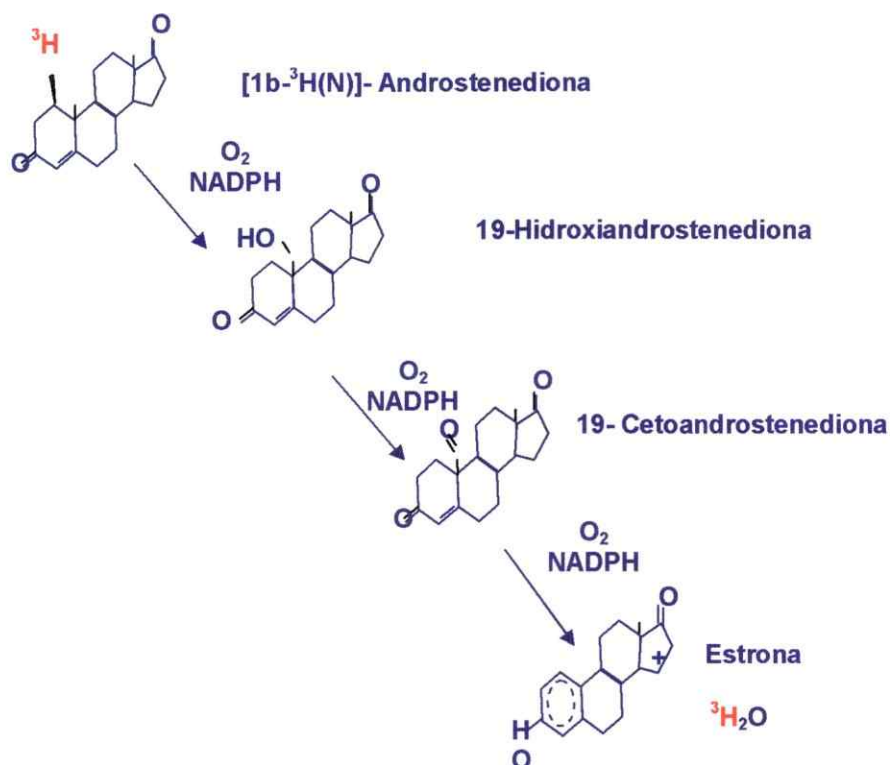


Figura 3: Esquema de las reacciones catalizadas por la enzima aromatasa. En rojo se muestra la molécula de tritio que se detecta en la medición de la actividad de la enzima cuando se utiliza el sustrato radioactivo, como se describe en Materiales y Métodos.

Por otra parte, diversos estudios clínicos demuestran que existe una estrecha relación entre masa ósea y contenido graso (Thomas y col, 1999). Dentro de los muchos factores asociados con la osteoporosis, el sobrepeso de los individuos es relevante. De hecho se ha visto que mujeres con exceso de peso se encuentran más protegidas contra la osteoporosis post-menopáusica que aquellas mujeres que tienen peso normal o bajo peso (Goulding y Taylor, 1998; Odabasi y col, 2000; Karsenty, 2001). La leptina, es una proteína de 16 kDa secretada por las células adiposas, participa en la regulación de la ingesta de alimentos y el gasto de energía a nivel del sistema nervioso central y también a nivel de los tejidos periféricos. Por esta razón se propuso a la leptina como un factor anti-obesidad envuelto directamente en un feedback entre adipocitos e hipotálamo (Zhang y col, 1994). Se ha propuesto a esta proteína como la encargada de producir la protección de las mujeres obesas ante la osteoporosis (Considine y col, 1996; Thomas y col, 2000). Aunque los niveles plasmáticos de leptina se encuentran aumentados en la obesidad, no se ha encontrado una relación directa entre niveles plasmáticos de leptina y densidad mineral ósea, aunque estudios en modelos muestran que leptina actúa sobre las células de estroma de médula ósea aumentando su diferenciación hacia osteoblastos e inhibiendo su diferenciación a adipocitos (Thomas y col, 1999).

Parece interesante entonces estudiar el efecto que tiene leptina sobre los procesos osteogénicos y adipogénicos, aunque los datos existentes hasta ahora parecen paradójales. Mientras se ha observado un efecto protector de la obesidad sobre la osteoporosis, no se ha encontrado una relación directa entre los niveles plasmáticos de leptina y la masa ósea (Thomas y Burguera, 2002). Sin embargo, se

ha observado que células progenitoras de médula ósea cultivadas en presencia de estímulos adipogénicos se diferencian hacia adipocitos y durante la diferenciación expresan y secretan altos niveles de leptina (Laharrague y col, 1998). Aunque los sitios precisos de acción de la leptina no son bien conocidos, se cree que sus efectos son mediados vía hipotálamo (Karsenty, 2001). Sin embargo, la amplia expresión del receptor de leptina en diferentes tejidos sugiere que leptina también podría actuar directamente en tejidos periféricos, lo que posiblemente estaría produciendo un efecto mayor en este caso (Tartaglia, 1997; Reseland y col, 2001; Holloway y col, 2002). Como resultado de splicing alternativo en el mRNA, existen tres isoformas del receptor de leptina con diferentes longitudes y secuencias C-terminal (Ghilardi y col, 1996; Kielar y col, 1998; Barr y col, 1999) un receptor de membrana con un dominio citoplasmático corto sin función de transducción de señales, un receptor de membrana con un dominio citoplasmático largo con la habilidad de transducir señales, y un supuesto receptor de leptina soluble (Chen y col, 1996; Lee y col, 1996). Los receptores de leptina (OB-R) de cadena corta y larga han sido encontrados en células óseas o sus precursores (Glauber y col, 1995; Thomas y col, 1999; Reseland y col, 2001; Kim y col, 2003). Se han visto variaciones en los contenidos de OB-R dependiendo del origen celular y la etapa de diferenciación (Siegrist-Kaiser y col, 1997; Thomas y col, 1999; Glasow y col, 2001) pero la cantidad de proteína OB-R no ha sido medida en forma cuantitativa.

De acuerdo con los datos reportados en la literatura, leptina tendría un efecto aumentando la maduración osteogénica e inhibiendo la maduración tardía de los adipocitos y no a nivel del compromiso de las células progenitoras a diferenciarse.

Es decir q tiene una acción aumentando la osteogénesis en los progenitores de la medula e inhibiendo la maduración tardía de los adipocitos (Thomas y col, 1999). Se ha observado que leptina aumenta la actividad de MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) (Takahashi y col, 1997), lo cual ha servido para establecer una relación entre MAPK y adipogénesis. La activación de MAPK, mediada por leptina, fosforila PPAR γ lo cual resulta en la disminución de su actividad transcripcional (Jaiswal y col, 2000). Además, se sabe que leptina aumenta la actividad aromatasa en líneas celulares inmortalizadas. Todos estos datos apoyan la hipótesis que leptina es un regulador fisiológico de las vías de diferenciación osteogénicas y adipogénicas y que posiblemente esta regulación sea por la vía de la enzima aromatasa.

Todos estos hallazgos conllevan a que sea de gran importancia analizar la actividad aromatasa en MSC's y la influencia que pueda tener leptina en esta actividad además de observar como influyen otros compuestos osteogénicos tales como la vitamina D. Es sabido que la deficiencia de vitamina D es un factor importante de riesgo en la pérdida de masa ósea. Incluso, deficiencias severas son causa de osteomalacia, disminución de la mineralización ósea, fracturas espontáneas y dolor de hueso (Bouillo y col, 1995). También se sabe que la vitamina D incrementaría los transcritos de *cyp 19* en células de hueso (Tanaka y col, 1996).

Vitamina D, además de estar implicada en la absorción de calcio a nivel intestinal, cumple un rol muy importante en la regulación de la homeostasis del calcio junto con la hormona paratiroidea (PTH) y la calcitonina a nivel del intestino y del hueso. Estudios en modelos de líneas celulares muestran que la vitamina D

inhibe el paso de pre-adipocito hacia adipocito maduro (Sato y Hiragun, 1988) e inhibe la adipogénesis en células de médula ósea de rata (Kelly y Gimble, 1998).

En esta tesis, MSC's aisladas desde muestras de médula ósea provenientes de donantes normales y osteoporóticas, se mantuvieron en cultivo en condiciones basales, de diferenciación osteogénica y adipogénica, y se cuantificaron los niveles de actividad aromatasa. También, se determinaron los niveles de actividad aromatasa frente al estímulo de leptina y vitamina D. Por último, se determinó la expresión de la enzima aromatasa en diferentes estímulos osteogénicos y adipogénicos.

Los resultados obtenidos en esta tesis se suman a los obtenidos previamente en este laboratorio y que apuntan a demostrar de manera más directa que las células progenitoras en la médula ósea de pacientes con osteoporosis postmenopáusicas se diferencian preferentemente hacia adipocitos. Estas evidencias obtenidas en modelos sin vida, contribuirán a apoyar la teoría lipídica de la osteoporosis, la cual es sustentada hasta ahora principalmente sobre la base de observaciones histomorfométricas y de datos clínicos.

Conocer los factores que participan en la regulación del balance osteogénesis-adipogénesis y sus mecanismos de acción en condiciones normales y patológicas (osteoporosis), ayudará a comprender el origen en la enfermedad y por lo tanto, permitirá intervenir dichos procesos, de forma tal de poder potenciar o tal vez revertir algún tipo de inhibición en el proceso osteogénico. Así, la inhibición de la adipogénesis en la médula en conjunto con un aumento en la osteogénesis puede representar una aproximación terapéutica novedosa para el tratamiento de las

enfermedades óseas relacionadas con la edad y la osteoporosis postmenopáusia (Nuttall y col, 1998; Nuttall y Gimble, 2000). Una terapia como esta, usada sola o en conjunto con agentes que inhiban la resorción ósea, puede ser más eficaz en la prevención o tratamiento de desórdenes óseos.

HIPÓTESIS

Leptina ejerce un rol protector del tejido óseo a través de una acción directa sobre las MSC's, debido a que leptina afecta la actividad de la enzima aromatasa en las MSC's, modificando de esta manera la síntesis de estrógenos locales.

OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

Objetivo General

- 1- Determinar si el rol protector de leptina sobre el tejido óseo se produce por un efecto directo sobre la actividad aromatasa en MSC's.
- 2- Comparar el efecto de leptina en células provenientes de donantes controles y osteoporóticas
- 3- Estudiar el efecto de leptina sobre la actividad aromatasa en MSC's derivadas de donantes controles y osteoporóticos.

Objetivos Específicos

- 1- Estudiar el efecto que tiene leptina sobre la actividad aromatasa en MSC's normales y osteoporóticas.

- 2- Estudiar el efecto que tiene leptina sobre la actividad aromatasa en condiciones de diferenciación osteogénica y adipogénica de las MSC's normales y osteoporóticas.
- 3- Estudiar si el aumento de la producción local de estrógenos da cuenta del efecto protector de leptina
- 4- Estudiar si los efectos producidos por leptina sobre la actividad aromatasa requieren de la activación de MAPK`s.
- 5- Comparar los efectos producidos por leptina sobre la actividad aromatasa en células de pacientes normales y osteoporóticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de las pacientes donantes

Los individuos que participaron en este estudio fueron escogidos mediante los siguientes criterios de selección: edad, sexo, valores de densidad mineral ósea, ausencia de patologías que puedan asociarse a la osteoporosis y ausencia de tratamientos o terapias de reemplazo hormonal con estrógeno o glucocorticoides (Haynesworth y col, 1992).

Todas las donantes, son mujeres postmenopáusicas de entre 65 y 85 años de edad que ingresaron al Servicio de Ortopedia y Traumatología del Hospital Sótero del Río para ser sometidas a cirugía por fractura de cadera o de algún miembro inferior, como parte de su tratamiento. A cada una de estas mujeres se le solicitó su autorización por escrito para la obtención de la muestra de médula ósea durante el procedimiento quirúrgico al cual serían sometidas. Previamente, se les informó como iba a ser el procedimiento de extracción de muestra, el cual consistiría en una aspiración de médula ósea desde la cresta iliaca en el momento de la intervención, de forma tal que la obtención de esta muestra no implicaría ningún riesgo para la potencial donante, que no se extraería una cantidad mayor de tejido que el estrictamente necesario para el estudio posterior y que se podía negar a participar de este estudio, lo cual no implicaba ningún cambio en su atención médica. Todo este procedimiento se realizó con la aprobación de los Comité de Ética del Hospital Sótero del Río y del INTA.

A cada una de las donantes se le midió la densidad mineral ósea (DMO) por densitometría ósea. Para diagnosticar el nivel de osteoporosis, se utilizó el

parámetro estadístico llamado "T-score", el cual se define como la relación de DMO (g/cm^2) del paciente con respecto al promedio de DMO que tiene un individuo joven normal de 21 años. Este parámetro, además de establecer el riesgo de fractura, permite clasificar a la población de acuerdo a la densidad mineral ósea del paciente (Organización Mundial de la Salud, 1994). Según esta estratificación, se puede agrupar a la población en cuatro diferentes grupos, de acuerdo al valor de T-score.

Como se muestra en la Tabla 1, el primer grupo corresponde a los individuos con diagnóstico normal o controles, los cuales presentan un valor de T-score mayor de $-1,0$ desviación estándar (DS), respecto del adulto joven normal. Los individuos del segundo grupo, que corresponde a un T-score de entre $-1,0$ y $-2,5$ DS, presentarían algún grado de osteopenia. Los individuos del grupo 3 son osteoporóticos y presentan un valor de T-score inferior a $-2,5$ DS; si en el caso de estos individuos, además presentan episodios de fracturas frecuentes, se les ubica en el grupo cuatro y su osteoporosis se clasifica como severa (Raiz, 1997).

De acuerdo a esta clasificación, para este estudio las donantes seleccionadas para el grupo control corresponden a individuos pertenecientes a los grupos 1 y 2 y las donantes seleccionadas para el grupo osteoporóticas corresponden a individuos de los grupos 3 y 4.

Tabla 1: Tabla de diagnóstico de osteoporosis.

GRUPO	T-score	DIAGNOSTICO
1	Masa ósea mayor de -1,0 DS del valor de adulto joven normal	Normal
2	Masa ósea entre -1,0 a -2,5 DS del valor de adulto joven normal	Osteopenia
3	Masa ósea menor de -2,5 DS del valor de adulto joven normal	Osteoporosis
4	Masa ósea menor de -2,5 DS del valor de adulto joven normal con una o mas fracturas	Osteoporosis severa

Tabla 1: La clasificación de las donantes se realizó de acuerdo al *t score*, que corresponde a la densidad mineral ósea (DMO) de un paciente comparado con la DMO de un individuo joven normal.

Los valores de DMO de cada uno de los individuos involucrados en este estudio se obtuvieron por el método de Absorciometría de Doble Energía Radiológica (DEXA), en el laboratorio de Densitometría del INTA. La densitometría se obtuvo de dos puntos que presentaran una gran importancia biológica en el esqueleto debido a su frecuencia de fracturas. Por esta razón, se eligieron la cadera y la columna lumbar. Para estandarizar este método se estableció la medición de DMO entre L₂ – L₄ por ser las vértebras que presentan la menor posibilidad de interferencia con estructuras adyacentes. En la cadera, las regiones que se examinan son el cuello femoral, el trocánter y el triángulo de Ward (región central distal del cuello femoral) (Raiz, 1997).

En esta tesis, se evaluó la DMO en la cadera, en la columna (L₂ – L₄) y el cuerpo total. Para esto, se utilizó un densitómetro (Lunar DPX-L, Software 1,3z,

Lunar Corp. Madison WI. USA) el cual tiene una exactitud de un 98 a 99% y un error de reproducibilidad de un 1 a 2%

Obtención de MSC's desde la médula ósea

Las células troncales mesenquimáticas (MSC's) fueron aisladas desde la médula ósea de las donantes siguiendo el procedimiento descrito por Jaiswal y col. (1997). En resumen, 10 ml del aspirado de médula ósea fue agregado a 20 ml de Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM) (Sigma, St. Louis, MO. USA) que contenía 10% de suero fetal bovino (SF) (Gibco BRL, Gaithersburg, Md, USA) y 10% de penicilina en stock (10.000 U/mL)-estreptomicina (10.000 µg/mL) (medio de cultivo completo). Luego la suspensión fue centrifugada para obtener un pellet celular, descartando la capa de grasa y las células dañadas presentes en la muestra. Las células fueron resuspendidas en medio de cultivo completo y fraccionadas en un gradiente de densidad de Percoll al 70%.

La gradiente fue centrifugada a 1.600 rpm por 15 minutos formándose tres capas visibles, la fracción de baja densidad (1,03 g/ml) enriquecida en células troncales mesenquimáticas (Haynesworth y col., 1992; Jaiswal y col., 1997), la fracción de densidad media (1,10 g/ml) y la fracción de mayor densidad (1,14 g/ml). Para nuestro estudio, se colectó la fracción de baja densidad, la cual se lavó con medio de cultivo completo para eliminar las células muertas y los restos celulares que queden luego de la separación. Por esto, se lavó tres veces con medio de cultivo completo y de la suspensión celular se obtuvieron los cultivos primarios, que es el nombre que le asignamos al primer cultivo celular que obtenemos

directamente de las células separadas por la gradiente de Percoll. Para estos cultivos las células se plaquearon a una densidad de $1,2 \times 10^7$ células mononucleadas/100mm de placa (Nunc. Naperville, IL. USA).

Cultivos celulares

Los cultivos primarios son cultivados en una atmósfera húmeda al 5% de CO₂, a 37°C. Después de 5 días de haber sido plaqueadas, se remueven las células no adherentes y se les vuelve a agregar medio de cultivo completo fresco. Después de esto, a los cultivos se les reemplaza el medio por medio de cultivo completo fresco dos veces a la semana. Cuando los cultivos están cerca de la confluencia, las células son liberadas desde la placa de cultivo por un tratamiento suave con una solución de tripsina al 0,25% por 5 minutos a 37°C y las células liberadas son contadas en un hemocitómetro. Luego las células son plaqueadas en placas de 100 mm (3) de forma de sembrar aproximadamente 3×10^5 células por placa (primer subcultivo). Este proceso se repite hasta obtener el cuarto subcultivo, luego del cual se realizan los experimentos descritos en esta tesis. Las células se cultivan hasta el cuarto subcultivo para aumentar la homogeneidad celular en la muestra y la cantidad de células en la misma.

Criopreservación

Parte de las MSC's cultivadas fueron criopreservadas luego del segundo subcultivo, para su posterior utilización. Las MSC's se liberan de la placa como se describió anteriormente, y se resuspenden en mezcla de criopreservación fría,

compuesta por 90% de suero fetal bovino y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma). Luego las MSC's se traspasan en la mezcla de criopreservación a criotubos a una densidad de 1×10^6 células/ml, son sometidas a un descenso gradual de la temperatura hasta alcanzar $-196 \text{ }^\circ\text{C}$ y posteriormente son almacenadas en nitrógeno líquido. En esta tesis no se observaron diferencias significativas entre los resultados obtenidos con células que fueron sometidas al proceso de criopreservación y con células que no fueron criopreservadas.

Diferenciación de MSC's

Las MSC's obtenidas de las donantes controles y osteoporóticas fueron inducidas a diferenciarse al linaje osteogénico o adipogénico para los ensayos de medición de actividad aromatasa, western blot e inmunofluorescencia realizados en esta tesis y que serán descritos posteriormente.

Diferenciación osteogénica

Para la diferenciación osteogénica, en el momento que las células alcanzan la confluencia en la placa, las MSC's se lavaron con PBS 1X para reemplazar el medio basal DMEM-SF por medio osteogénico (OS), compuesto por DMEM-SF suplementado con dexametasona 100 nM, β -glicerolfosfato 10 mM (Sigma) y 50 $\mu\text{g/ml}$ de ácido ascórbico (Sigma), agregado diariamente (Schutze y col, 2005). Para los ensayos de medición de la actividad aromatasa las células se cultivaron por 0, 24, 48, 72 y 168 horas en medio OS; mientras que para los ensayos de western blot e inmunofluorescencia solo se cultivaron por 24 horas con este medio.

Para analizar el efecto de leptina, se adicionó leptina recombinante humana (Chemicon International) al medio OS a una concentración final de 200nM. Cuando se estudió el efecto de vitamina D se agregó al medio OS, 1,25 dihidroxivitamina D₃ a una concentración final de 10 nM. En ambos casos, para los ensayos de medición de actividad aromatasa las células se cultivaron por 0, 24, 48, 72 y 168 horas y para los ensayos de western blot e inmunofluorescencia solo se cultivaron por 24 horas en medio OS.

Diferenciación adipogénica

Para el proceso de diferenciación adipogénico, las células al alcanzar la confluencia se lavaron con PBS 1X para reemplazar el medio basal DMEM-SF por medio adipogénico (AD), compuesto por DMEM-SF suplementado con dexametasona 1 µM, isobutilmetilxantina (IBMX) 100 µg/ml (Calbiochem), indometacina 100 µM (Sigma) e insulina 10,5 µg/ml (Novo Nordisk) (Schutze y col, 2005). Para estudiar los efectos de leptina en conjunto con el medio AD se adicionó leptina recombinante humana (Chemicon International) a una concentración final de 200 nM; cuando se estudiaron los efectos de vitamina D, se agregó al medio AD, 1,25 dihidroxivitamina D₃ a una concentración final de 10 nM.

Medición de la actividad aromatasa.

La actividad aromatasa se midió luego que las células fueron sometidas a diferenciación osteogénica o adipogénica por 24, 48, 72 y 168 horas. Para ésto, se incuban las células con 1-β (³H-N) androstenediona durante 2 horas a una

concentración final de 30 nM. Luego, las placas se ponen en hielo por 15 minutos para condensar el vapor dentro de ellas. Posteriormente, se transfiere el medio a tubos de ensayo que contienen 600µl de ácido tricloroacético (TCA) al 30% a 5°C, para precipitar las proteínas presentes en el medio. Luego se agregan 200 µl de PBS 1X para remover los últimos restos de medio de la placa y se agregan a los tubos de ensayo. Después de agitar en vortex, se espera 10 minutos a 5°C y luego se centrifuga a 2.500 rpm por 15 minutos, para separar los restos de proteínas. El sobrenadante se agrega a tubos de ensayo que contienen 4 ml de cloroformo para separar la fase acuosa donde se encuentra el agua tritiada, que será medida posteriormente. Se agitan continuamente en vortex por 3 minutos y se centrifugan a 1.000 rpm por 10 minutos. Se extrae 1 ml de la fase acuosa y se le agrega una solución de carbón-dextrano (solución 5% carbón/0,5% dextrano en agua destilada) y se mantiene a 5°C con agitación constante por 10 minutos; luego se centrifugan las muestras a 2.500 rpm por 15 minutos. El sobrenadante que contiene toda el agua de la muestra se transfiere a frascos que contienen líquido de centelleo (Ecoscint, Nacional laboratorios) para la medición del agua tritiada (el tritio marcado con rojo en la figura 3, es el que obtenemos y cuantificamos en esta etapa), la cual se realiza en un contador de centelleo (Packard Tri Carb 1600 TR Liquid Scintillation Analyzer,).

Efecto del inhibidor PD 98059 sobre actividad aromatasa

Para estudiar si el inhibidor de la vía de las MAPK, PD98059, afectaba la acción de leptina sobre la actividad aromatasa, a las MSC's cultivadas por 24 horas

en medio OS solo o en presencia de leptina se les agregó este inhibidor, a una concentración final de 25 μ M. La adición del PD98059 se realizó 1 hora antes de agregar los otros estímulos.

Inmunofluorescencia.

Las diferencias de expresión y la distribución intracelular de la enzima aromatasa en las MSC's, fueron evaluadas por inmunofluorescencia. Para ésto, se sembraron las células sobre cubreobjetos de vidrio en placas de 24 pocillos a una concentración de 15.000 células por pocillo. Posterior al estímulo de 24 horas (basal, osteogénico o adipogénico) utilizado para los distintos experimentos, las células se lavaron dos veces con PBS 1X, luego se fijaron y permeabilizaron con metanol, durante 10 minutos a -20°C . Posteriormente, se realizaron dos lavados con PBS 1X, y se bloqueó con una solución de BSA al 3% (Gibco BRL Life Technologies) en TBS 1X, por 30 minutos a temperatura ambiente. Enseguida, las células se incubaron con el anticuerpo primario específico (goat anti-CYP 19 (H-18) (Santa Cruz Biotechnology), diluido 1:250 en BSA al 3% en TBS) durante 45 minutos a 37°C . Luego, se lavaron las células dos veces con PBS 1X, y se incubó con el anticuerpo secundario respectivo, anti-goat conjugado a FITC (Rockland, PA, USA), diluido 1:250 en BSA al 3% en TBS, durante 30 minutos a 37°C . En seguida se lavaron las células tres veces con PBS 1X, dos veces con agua destilada, y se montaron con medio de montaje (Dako Cytomation Fluorescent) y se dejaron a temperatura ambiente por 20 minutos, antes de analizarlas en un microscopio de

epifluorescencia (Nikon). Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital Kodak Digital Science DC120.

Lisis Celular

Para analizar si diferencias en la actividad de la enzima aromatasa medida en MSC's sometidas a diferenciación OS y AD se corresponden con cambios en los niveles de expresión de la enzima, homogenizados celulares fueron fraccionados por PAGE y la enzima fue detectada en ensayos de western blot. Para ésto, las células se cultivaron en medios de diferenciación OS y AD (con o sin leptina; con y sin vitamina D; con y sin PD98059) por 24 horas. Luego las células se lavaron dos veces con PBS 1X y se lisaron de acuerdo al protocolo descrito por Catalano y col. (2003), para obtener las proteínas de cada una de las muestras que posteriormente se utilizarían en el ensayo de western blot. Brevemente, las células son incubadas con buffer de lisis (50mM HEPES pH 7,5, 150mM NaCl, 1,5mM MgCl₂, 10% glicerol, 1% Triton X-100), suplementado con inhibidores de proteasas (0,5mM de aprotinina, 0,5mM de PMSF (Sigma) y 0,5mM de ortovanadato de sodio (Sigma)), durante 10 minutos, y luego fueron sometidas a rompimiento mecánico con un Cell Scraper (Orange Scientific). El lisado fue centrifugado a 14.500 rpm durante 15 minutos, para separar los restos de membrana, y el sobrenadante fue almacenado a -20°C, adicionándole los inhibidores de proteasas. La concentración de proteínas en los lisados celulares se midió utilizando el kit Bio Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories).

Western Blot.

Las proteínas del lisado celular (30 µg) se denaturaron con buffer de carga (SDS 2%, glicerol 10%, tris 0,06M pH 6,8, azul de bromofenol 0,01%, β-mercaptoetanol 5%) durante 5 minutos a 100°C. Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE electroforesis en geles de acrilamida (Bio-Rad) al 10% y fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) durante 1 hora a 100 V. Las membranas fueron bloqueadas con leche libre de grasa (descremada) al 5% en TBS-Tween 0,05% o con BSA 3% en TBS-Tween 0,05%, durante 1 hora. La incubación con el anticuerpo primario correspondiente (goat anti-CYP 19 (H-18), dilución 1:1.000 y anti-β actina, dilución 1:5.000 Sigma) se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente se incubó durante 45 minutos con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a peroxidasa a una dilución 1:10.000 (anticuerpos anti-goat y anti-mouse conjugados a HRP, Rockland, respectivamente). Las bandas inmunoreactivas fueron visualizadas mediante un kit de quimioluminiscencia (Perkin Elmer Life Sciences, USA). Como control positivo se utilizó la línea celular MCF-7 que expresa la enzima aromatasa, como ha sido descrito en la literatura (Catalano y col, 2003).

Para la cuantificación de la intensidad de las bandas, se revelaron las bandas inmunoreactivas utilizando membranas radiográficas (Agfa y Amersham). Las membranas fueron escaneadas y analizadas mediante el software densitométrico Kodak Digital 1D, identificando las bandas a cuantificar de acuerdo al tamaño molecular correspondiente según el estándar de peso molecular utilizado en cada uno de los ensayos.

Reactivos

Los medios de cultivo celular y reactivos utilizados fueron provistos por Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA) o Gibco/BRL. (Gaithersburg, Md, USA). Los utensilios de material plástico utilizados para los cultivos celulares fueron provistos desde Nunc (Naperville, IL, USA).

RESULTADOS

Pacientes

Las MSC's se aislaron desde la médula ósea de pacientes que fueron sometidas a cirugía como parte de su tratamiento. Luego de medir por densitometría ósea la DMO en L₂ – L₄, las pacientes se clasificaron en normales u osteoporóticas según su valor de T-score. Para descartar una causa secundaria de osteoporosis, se realizaron las siguientes determinaciones VHS, calcemia, fosfemia, fosfatasas, GOT, GPT, N ureico, creatinina, calciuria y TSH. En la Tabla 2 se muestran las características de los grupos de donantes utilizados en esta tesis.

Tabla 2: Características de las donantes utilizadas en esta tesis.

Categoría	Nº	Edad	Columna Lumbar (T score)	Cadera
Normal	3	70,7 ± 9	-1,5 ± 0,5	-2,1 ± 0,4
Osteoporótica	3	73,3 ± 13	-4,1 ± 0,9	-3,3 ± 0,3

Tabla 2: Resumen de algunas características de las donantes utilizadas en esta tesis, según categoría (normal u osteoporótico), número, edad, T-score y T-score de cadera.

Actividad aromatasa en MSC's.

La actividad aromatasa se determinó en MSC's cultivadas en condiciones basales y en condiciones de diferenciación osteogénica y adipogénica. En condiciones basales las MSC's presentan una actividad aromatasa muy baja, con valores solo levemente superior al valor del blanco. Sin embargo, cuando las células son sometidas por tiempos variables (24, 48, 72 y 168 h) a estímulos osteogénico o adipogénico la actividad aumenta en forma significativa (Figura 4A, B).

Así, como se observa en la figura 1, existe un aumento importante de la actividad aromatasa al agregar cualquiera de los dos estímulos de diferenciación, presentando un máximo de actividad a las 24 horas, para luego decaer hacia el día 7, tiempo en el cual la actividad enzimática se mantiene mas elevada que la actividad medida en condiciones basales (sin estímulo de diferenciación).

En condiciones osteogénicas (Figura 4A), se produce un aumento significativo de la actividad aromatasa, con un pico máximo de actividad a las 24 horas de estímulo (544, 5 fmol/mg de prot.), que es 44 veces mayor que la actividad medida en condiciones basales. Aunque se mantenga el estímulo osteogénico en el tiempo, se produce una abrupta disminución de la actividad aromatasa a las 48 horas de estímulo (99,2 fmol/mg de prot.), para continuar decayendo hasta el día 7 (tiempo máximo medido); sin embargo, esta disminución no es tan pronunciada. La actividad a los 7 días llega a ser dos veces mayor que la actividad medida en condiciones basales a ese mismo tiempo.

En condiciones adipogénicas (Figura 4B), al igual que en condiciones osteogénicas, se produce un aumento significativo de la actividad aromatasa al

agregar el estímulo AD con un pico máximo de actividad aromatasa también a las 24 horas de estímulo (245,7 fmol/mg de prot.), el cual es 20 veces mayor que la actividad aromatasa en condición basal. La actividad se mantiene elevada hasta el día 3 de diferenciación, luego de lo cual disminuye hasta el día 7, aunque a diferencia de lo que ocurre con la actividad aromatasa en condiciones de diferenciación osteogénica, no lo hace de manera tan abrupta ni en igual magnitud. Así, el valor de la actividad al día 7 de diferenciación adipogénica es 6 veces mayor que la actividad aromatasa en condición basal.

Figura 4: Actividad aromatasa bajo estímulo osteogénico y adipogénico.

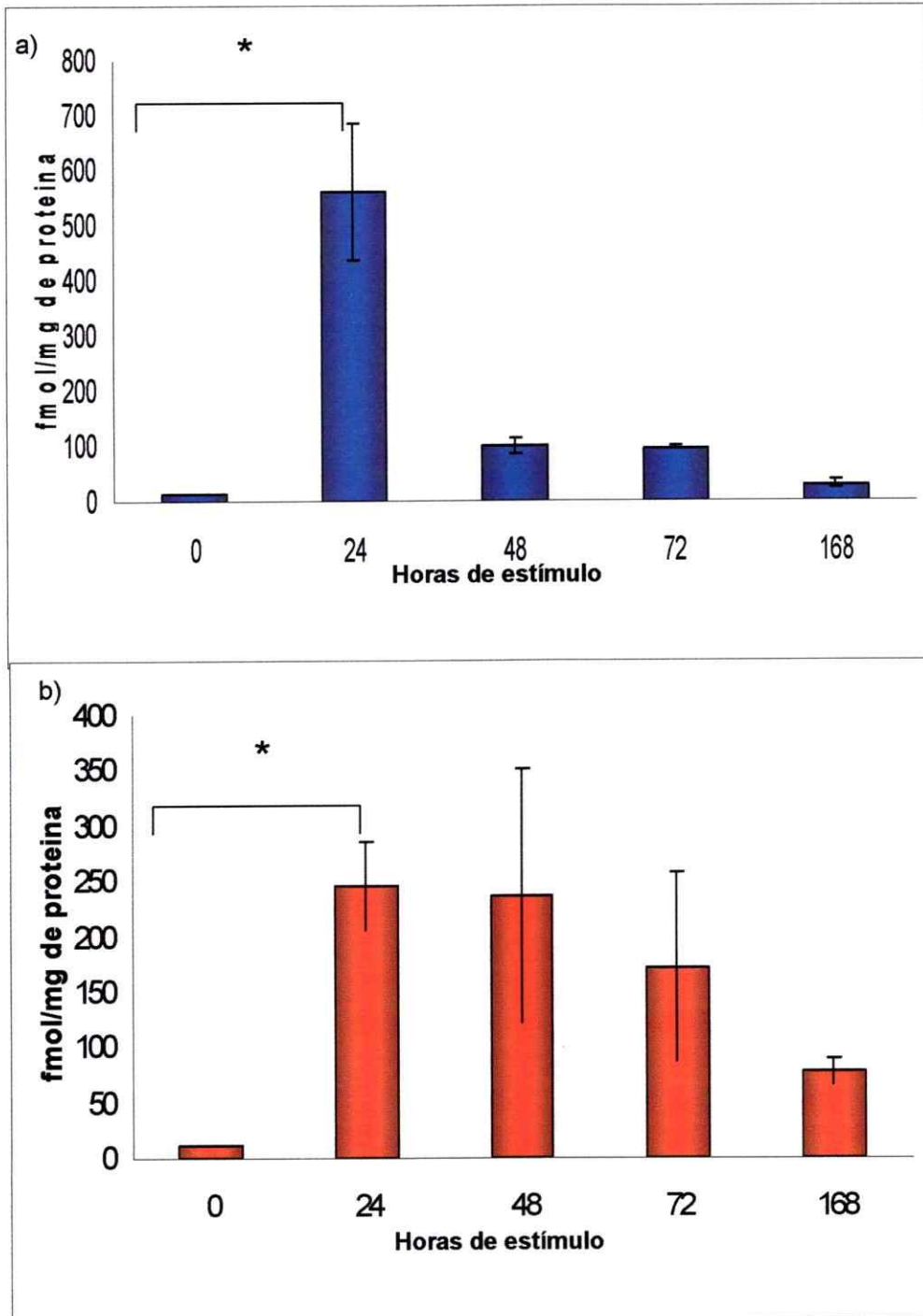


Figura 4: actividad aromatasa medida en fmol/mg de proteína bajo estímulos, a diferentes tiempos (0, 24, 48, 72 y 168 horas), de diferenciación osteogénico y adipogénico (b). Promedio de valores medidos en duplicado de muestras de dos pacientes totales. * indica la evaluación estadística por el método de T-student.

Efecto de leptina sobre actividad aromatasa.

En células cultivadas en condiciones basales, la adición de leptina al medio de cultivo no mostró tener ningún efecto sobre la actividad aromatasa. Sin embargo, cuando se adiciona leptina al medio osteogénico, la actividad aromatasa aumenta significativamente. Como se observa en la Figura 5, a las 24 horas de estímulo con medio OS el efecto de leptina fue dosis dependiente. A partir de estos datos, se eligió la concentración de 200 nM final en la placa de cultivo, para realizar todos los ensayos siguientes. Con la concentración de leptina adecuada para cada ensayo se procedió a cuantificar la actividad aromatasa en los mismos tiempos medidos anteriormente para los dos medios de diferenciación utilizados.

Figura 5: Actividad aromatasa bajo estimulo osteogénico a diferentes concentraciones de leptina.

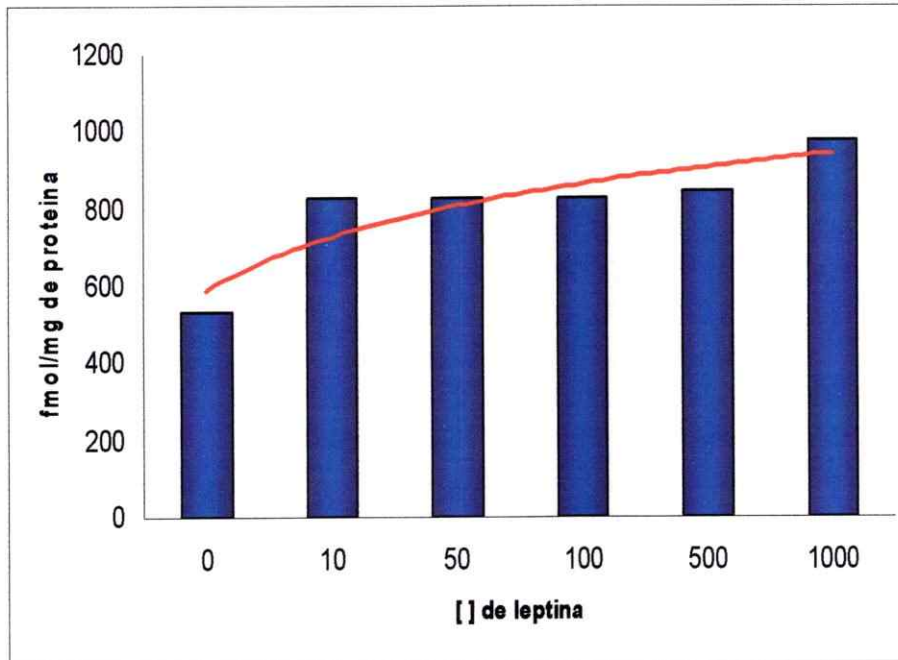


Figura 5: Actividad aromatasa medida luego de 24 horas de diferenciación osteogénica en presencia de diferentes concentraciones de leptina (0, 10, 50, 100, 500, 1000 $\mu\text{g/mL}$). La actividad se expresa en fmol/mg de proteína y corresponden al promedio de valores medidos en duplicado de muestras de un paciente total.

Como se muestra en la Figura 6, solo cuando se agregó el estímulo de leptina en conjunto con alguno de los dos estímulos de diferenciación, se produjo un aumento en la actividad aromatasa. Además, la adición de leptina a células sometidas a diferenciación osteogénica produjo un aumento cercano al doble en la actividad aromatasa (549,6 fmol/mg de prot.) comparado con la actividad en ausencia de leptina. El efecto máximo se alcanza a las 24 h de diferenciación. Para el medio adipogénico, no se apreció una variación significativa en la actividad aromatasa cuando se agregó leptina al medio. El aumento producido por leptina en

la actividad aromatasa hace aún mas pronunciada la diferencia entre las actividades medidas bajo estímulo OS comparada con la medida bajo estímulo AD.

Figura 6: Actividad aromatasa bajo estímulo de leptina.

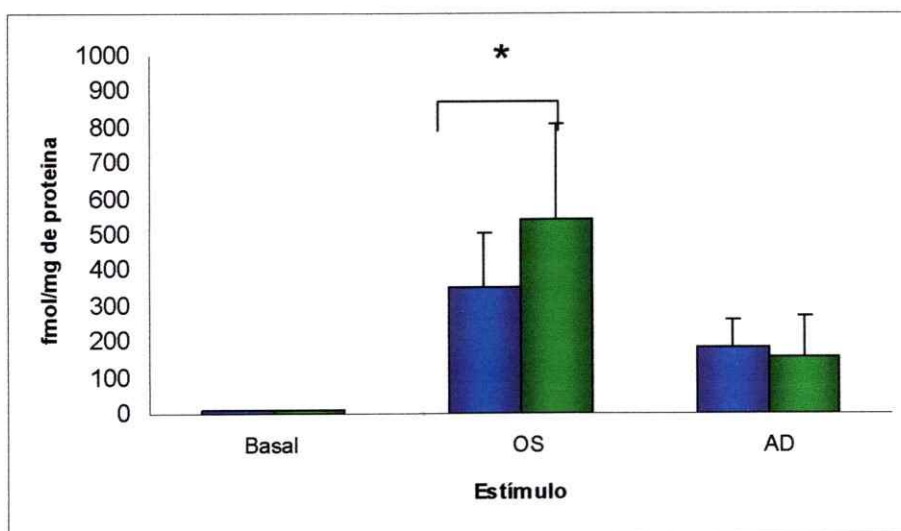


Figura 6: Actividad aromatasa medida luego de 24 horas de estímulo osteogénico (oste) y adipogénico (adipo) en presencia (barras verdes) o ausencia (barras azules) de 200 nM de leptina. La actividad se expresa en fmol/mg de proteína y corresponde al promedio de valores \pm desviación estándar medidos en duplicado de muestras de ocho pacientes totales. * $p < 0,05$.

Efecto de vitamina D sobre actividad aromatasa.

Además de medir los cambios inducidos por leptina en la actividad aromatasa, se realizaron experimentos similares con vitamina D, otro de los factores protectores del tejido óseo postulados en la literatura. En células cultivadas en condiciones basales, la adición de vitamina D (10 nM) al medio de cultivo no mostró tener ningún efecto sobre la actividad aromatasa, al igual que lo ocurrido en el caso de la leptina. Sin embargo, la adición de vitamina D modificó los niveles de actividad aromatasa obtenidos en células cultivadas con medio de diferenciación OS (figura 7) llegando a ser 1,5 veces mas que sin la adición de vitamina D. Al igual que en el

caso de leptina, bajo el estímulo del medio AD no se vieron diferencias significativas.

Figura 7: Actividad aromatasa bajo estímulo de Vitamina D.

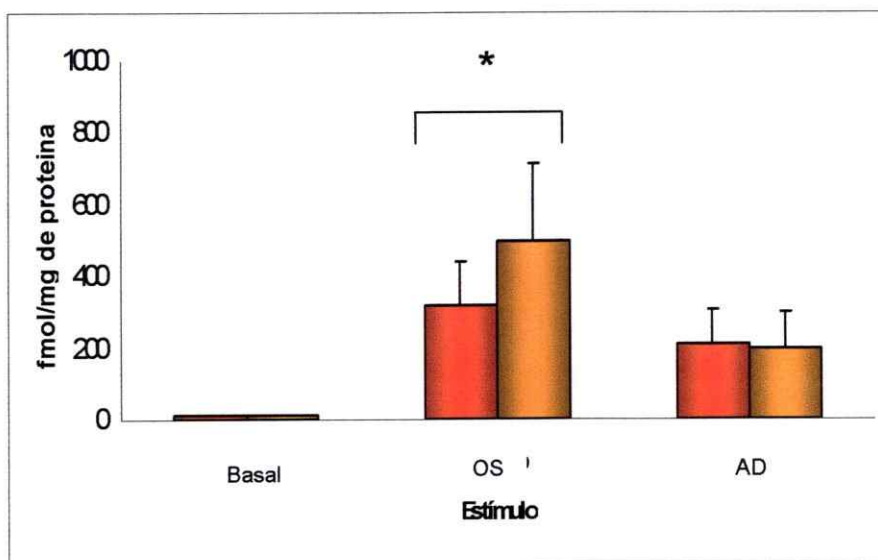


Figura 7: Actividad aromatasa medida luego de 24 horas de estímulo osteogénico (osteo) y adipogénico (adipo) en presencia (barras naranjas) o ausencia (barras rojas) de 10 nM vitamina D. La actividad se expresa en fmol/mg de proteína y corresponde al promedio \pm desviación estándar de valores medidos en duplicado de muestras de siete pacientes totales. * $p < 0,05$.

Cuantificación proteica de aromatasa

Al observar las diferencias de la actividad aromatasa en los ensayos anteriores, se quiso estudiar si el aumento que se produce en la actividad de la enzima luego de cultivar las MSC's en los medios de diferenciación OS y AD solos, o en conjunto con leptina, se podía explicar por un aumento de la expresión de la proteína aromatasa por estas células. Para ésto, se analizó por inmunofluorescencia la expresión y distribución intracelular de la enzima aromatasa, en las diferentes condiciones en que se midió la actividad enzimática. Como se muestra en la figura

8, no se apreciaron diferencias en la distribución e intensidad de la inmunofluorescencia luego de 24 h de los estímulos de diferenciación OS y AD y la condición basal. Para poder cuantificar la cantidad de proteína expresada en las diferentes condiciones estudiadas, se procedió a realizar un ensayo de western blot. Al igual que en el caso de la inmunofluorescencia, a las células se les agregó el estímulo OS o AD durante 24 horas, que es el tiempo al cual se obtiene el efecto máximo sobre la actividad enzimática. Como se observa en la figura 9, no se apreció una diferencia significativa en la expresión de la proteína aromatasa entre las distintas condiciones de estímulo a las cuales fueron sometidas las células. Incluso, la expresión de la proteína aromatasa por MSC's cultivadas en condiciones basales (sin estímulo de diferenciación) fue levemente mayor que en los casos en los que las células se cultivaron en medio de diferenciación OS y AD en presencia de leptina.

Figura 8: Inmunofluorescencia de MSC's para enzima aromatasa.

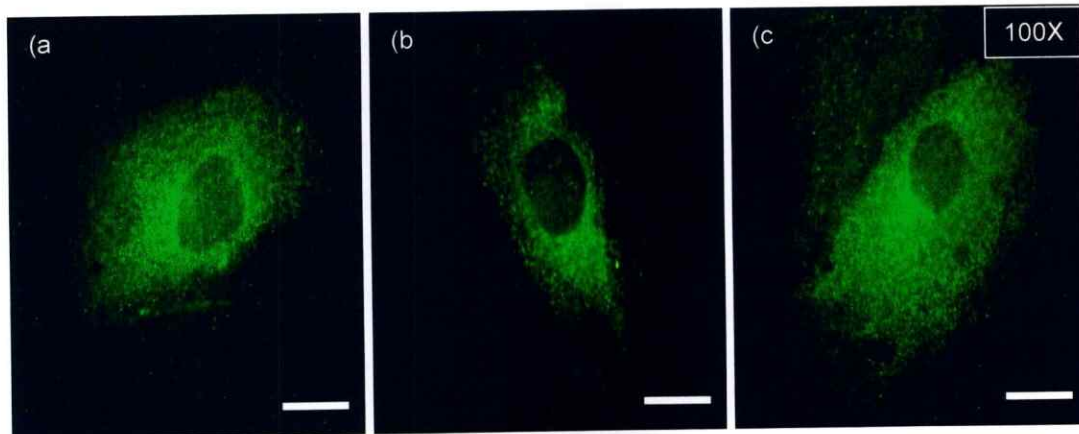


Figura 8: Inmunofluorescencias de MSC's bajo condiciones basales (a), de diferenciación osteogénica (b) y de diferenciación adipogénica (c). Las células fueron incubadas con el anticuerpo primario goat anti-CYP 19 (H-18) y el anticuerpo secundario anti-goat conjugado a FITC. La magnificación es de 100X. La barra corresponde a 10 μm .

Figura 9: Western blot de MSC's para enzima aromatasa.

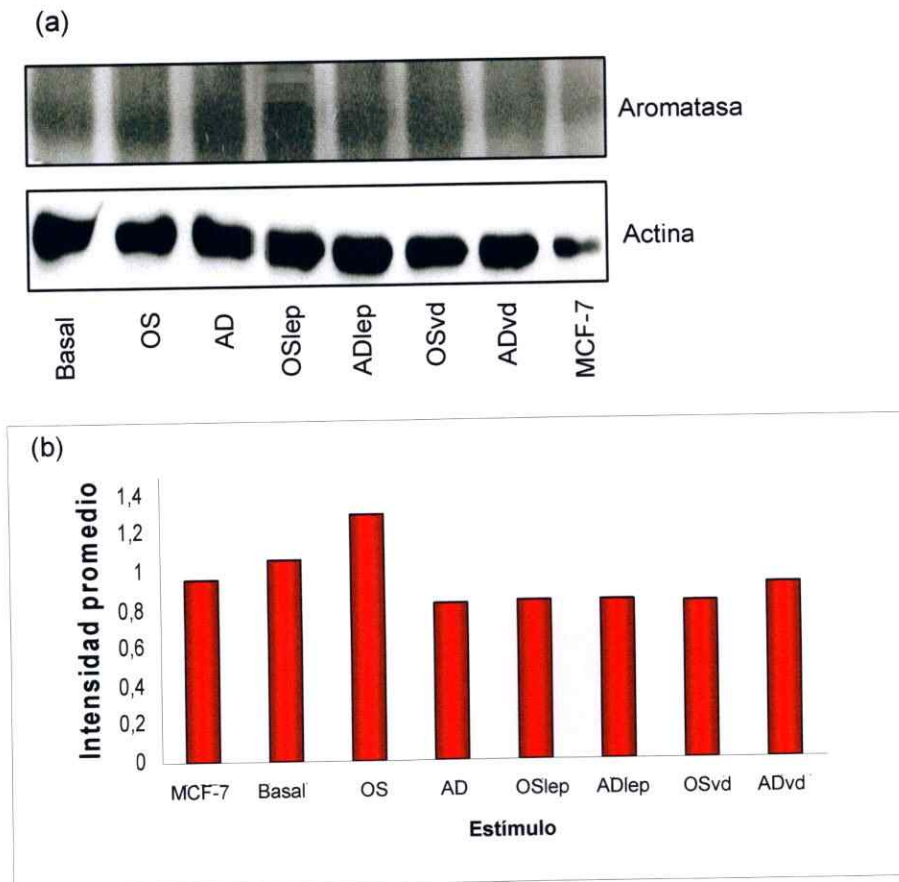


Figura 9: Cuantificación de los niveles de la proteína aromatasa en MSC's sometidas a estímulos de diferenciación. Las proteínas fueron separadas por western blot (a) y la intensidad de las bandas (b) fue analizada como se describe en Materiales y Métodos. MCF-7, corresponde al control positivo; Basal, corresponde a las MSC's sin estímulo de diferenciación, OS, corresponde a diferenciación osteogénica; AD, corresponde a diferenciación adipogénica; OSlep corresponde a diferenciación osteogénica en presencia de 200nM de leptina y OSvd, corresponde a diferenciación osteogénica en presencia de 10 nM de vitamina D. El tiempo de diferenciación es de 24 horas. Los valores de intensidad están normalizados por actina.

Efecto del inhibidor de la vía de las MAPK, PD98059, sobre la actividad aromatasa.

Como ha sido reportado que en diferentes líneas celulares (Watts y col, 1998), leptina ejerce su acción a través de la vía de las MAPK, quisimos estudiar si el aumento observado en la actividad aromatasa por efecto de la leptina, estaba relacionado con la activación de esta vía de transducción de señales. Para ésto, se realizó el ensayo de actividad aromatasa en células cultivadas en medio osteogénico en presencia o ausencia de leptina y en presencia o ausencia del inhibidor PD98059 (25 nM). Como se aprecia en la figura 10, la actividad aromatasa medida bajo condiciones de estímulo osteogénico, disminuye en un 80% cuando se agrega el inhibidor PD98059, aunque la actividad en estas condiciones se mantiene en un valor superior al de la actividad medida en condiciones basales (6 veces superior). De la misma manera, el aumento de actividad producido por leptina es revertido por el efecto del inhibidor, disminuyendo su actividad a un 40%, pero manteniéndose por encima del valor medido en condición basal (24 veces) y del valor de la actividad aromatasa medida en condiciones de diferenciación osteogénica en presencia del inhibidor PD98059 (4 veces).

Figura 10: Efecto de PD98059.

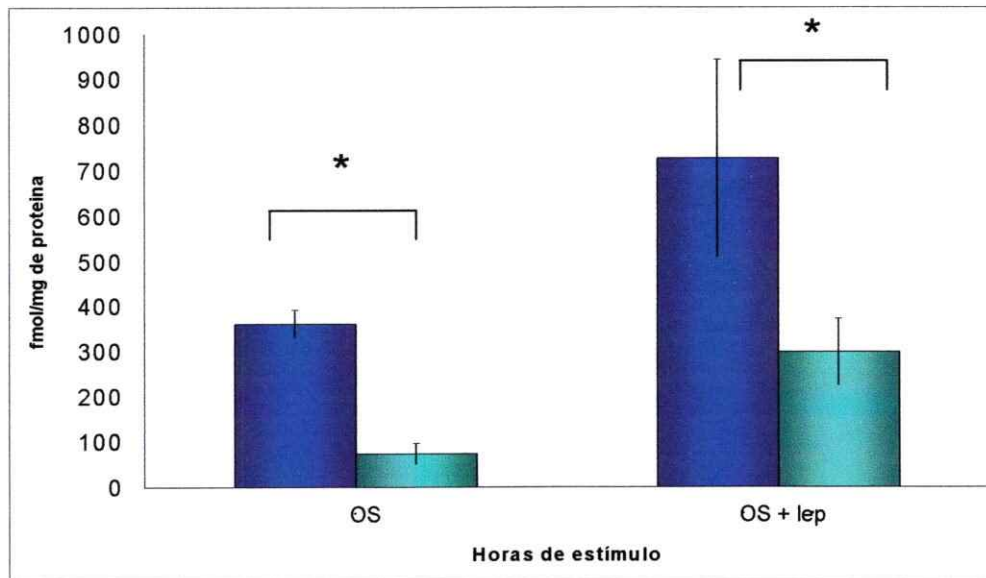


Figura 10: Actividad aromatasa medida luego de 24 horas de diferenciación osteogénica (OS) \pm 200 nM de leptina en ausencia (barras azules) o en presencia (barras calipso) del inhibidor de la vía de las MAPK, PD98059. La actividad se expresa en fmol/mg de proteína y corresponde al promedio \pm DE de valores medidos en duplicado de muestras de dos pacientes totales. * $p < 0,05$.

Nos interesó estudiar si la disminución de actividad aromatasa producida por el efecto del inhibidor de la vía de las MAPK, se podría explicar por una disminución en la expresión de la proteína aromatasa. En este ensayo se utilizaron las mismas condiciones que en el experimento de medición de actividad anterior, es decir, se midió la actividad en células sometidas a estímulos osteogénicos en ausencia o presencia de leptina 200 nM y con la adición o no del inhibidor PD98059. Como se observa en la figura 11, el ensayo de western blot no muestra una diferencia significativa en el nivel de la proteína aromatasa en las células cultivadas en presencia del inhibidor PD98059 que pudiera explicar la disminución observada en

la actividad enzimática. Es decir, la disminución de la actividad no se explica por una disminución en la expresión de la proteína. Este resultado es similar al mencionado en la "Cuantificación proteica de aromatasa", donde tampoco se explica el aumento de la actividad enzimática observada en condiciones de diferenciación por cambios en los niveles de la aromatasa.

Figura 11: Western blot de MSC's para enzima aromatasa con inhibidor PD98059.

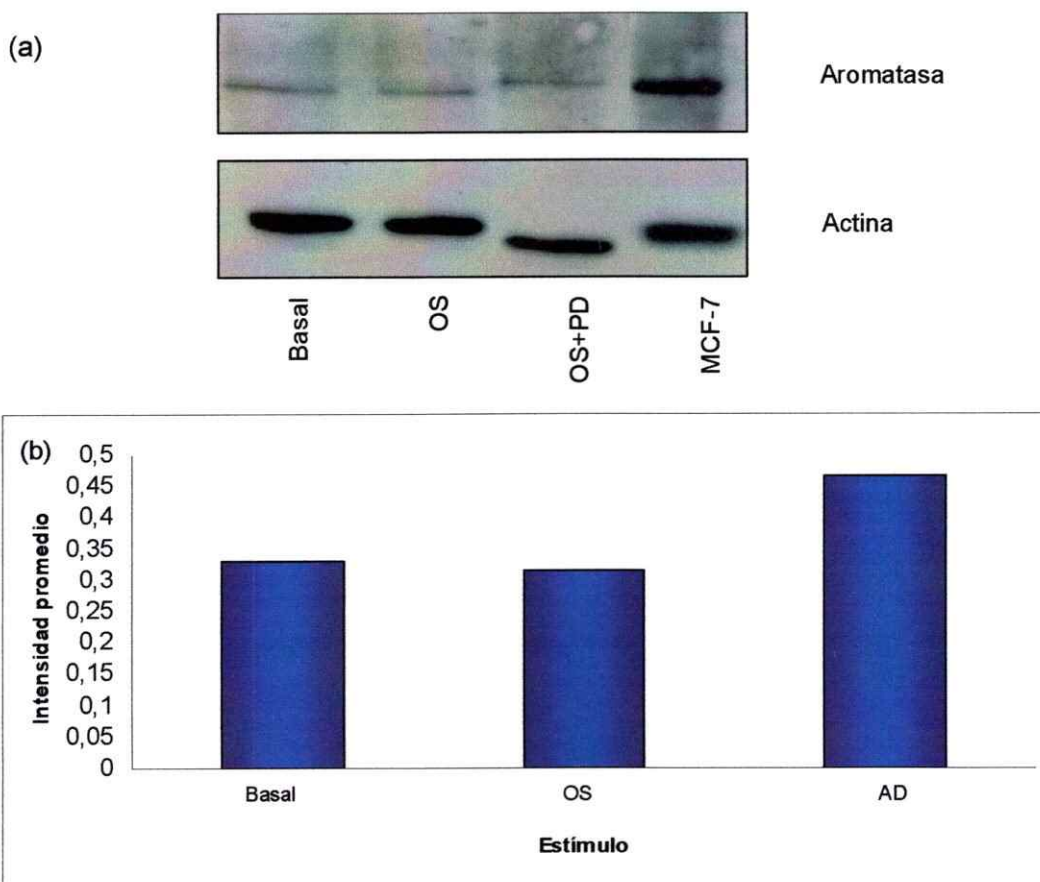


Figura 11: Cuantificación del nivel de la proteína aromatasa en MSC's, en condición basal, en diferenciación osteogénica (OS) en ausencia y presencia de 25 mM de PD980598. Las proteínas fueron separadas por western blot (a) y las bandas fueron cuantificadas (b) como se describe en Materiales y Métodos. Como control positivo se utilizó la línea celular MCF-7. En todos los casos el tiempo de incubación es de 24 horas. Los valores de intensidad están normalizados por actina.

Actividad aromatasa en MSC's controles y osteoporóticas.

Debido a la importancia que tiene la síntesis extragonadal de estrógenos en la post-menopausia, nos pareció interesante analizar si existían diferencias entre la actividad de la aromatasa en las MSC's obtenidas de pacientes normales y osteoporóticas.

Como se observa en la figura 12, no existe una diferencia significativa en la actividad aromatasa medida en condiciones basales (sin estímulo de diferenciación) entre las células obtenidas de pacientes normales y osteoporóticas. Sin embargo, en dicha figura si se puede observar que la actividad aromatasa medida en condiciones de diferenciación osteogénica es mayor en células de donantes normales que en las de pacientes osteoporóticas, a distintos tiempos de diferenciación. En ambos casos, el máximo de actividad se alcanza a las 24 horas de estímulo, pero la actividad aromatasa en células normales es dos veces mayor que la actividad en células osteoporóticas (Figura 12). También en dicha figura se observa que ambos tipos de células presentan un patrón de disminución de actividad similar en el tiempo; sin embargo, la pérdida de actividad es más pronunciada en las células osteoporóticas que en las normales. Así, en el día 7 de diferenciación, la actividad enzimática de células de pacientes normales y osteoporóticas es 9,5 y 2,4 veces mayor que la actividad en condiciones basales, respectivamente.

En la figura 13 se puede apreciar que la actividad aromatasa en células normales y osteoporóticas cultivadas en condiciones de diferenciación adipogénica mantiene un comportamiento similar en el tiempo de diferenciación, alcanzando un

máximo de actividad a las 24 h y decayendo hacia el día 7 de diferenciación, aunque manteniendo valores superiores al valor que presenta la actividad aromatasa en condición basal en este mismo día (13 y 6,4 veces para las pacientes normales y osteoporóticas, respectivamente). A las 24 h, cuando se observa el máximo de actividad, no existen diferencias significativas en células normales y osteoporóticas.

Al analizar la actividad aromatasa en su nivel máximo (24 horas), podemos observar que la actividad enzimática en condiciones de diferenciación osteogénica en donantes normales es 2 veces mayor que la actividad aromatasa en diferenciación adipogénica; esta diferencia no se aprecia en células osteoporóticas (Figura 14). La actividad aromatasa en condiciones adipogénicas para las células normales no presenta diferencias significativas con respecto de la medida en células osteoporóticas, en cambio en células normales bajo estímulo osteogénico es dos veces mayor la actividad aromatasa que la medida para células osteoporóticas en este mismo medio de diferenciación a las 24 horas de estímulo.

Figura 12: Actividad aromatasa en MSC's de donantes normales y osteoporóticas bajo estímulo osteogénico.

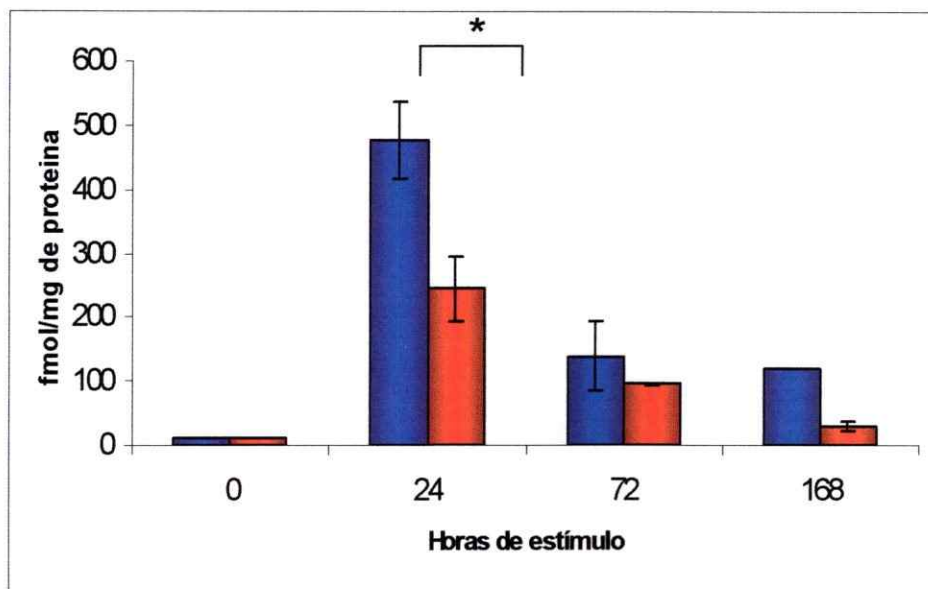


Figura 12: Medición de la actividad aromatasa medida a diferentes tiempos (0, 24, 72 y 168 horas) de diferenciación osteogénica en células de donantes normales (barras azules) y de donantes osteoporóticos (barras rojas). La actividad se expresa en fmol/mg de proteína y corresponde al promedio \pm de valores medidos en duplicado de muestras de tres donantes normales y de tres donantes osteoporóticas. * $p < 0,05$.

Figura 13: Actividad aromatasa en MSC's de donantes normales y osteoporóticas bajo estímulo adipogénico.

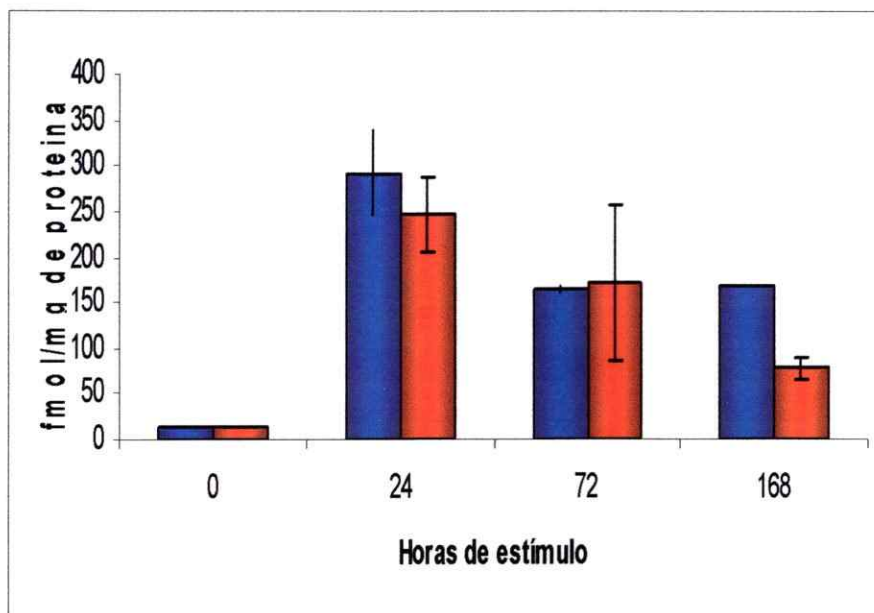


Figura 13: Medición de la actividad aromatasa medida a diferentes tiempos (0, 24, 72 y 168 horas) de diferenciación adipogénica en células de donantes normales (barras azules) y de donantes osteoporóticos (barras rojas). La actividad se expresa en fmol/mg de proteína y corresponde al promedio \pm de valores medidos en duplicado de muestras de tres donantes normales y tres donantes osteoporóticas. * $p < 0,05$.

Figura 14: Actividad aromatasa en MSC's de donantes normales y osteoporóticas bajo estímulo por 24 horas de diferenciación osteogénico y adipogénico.

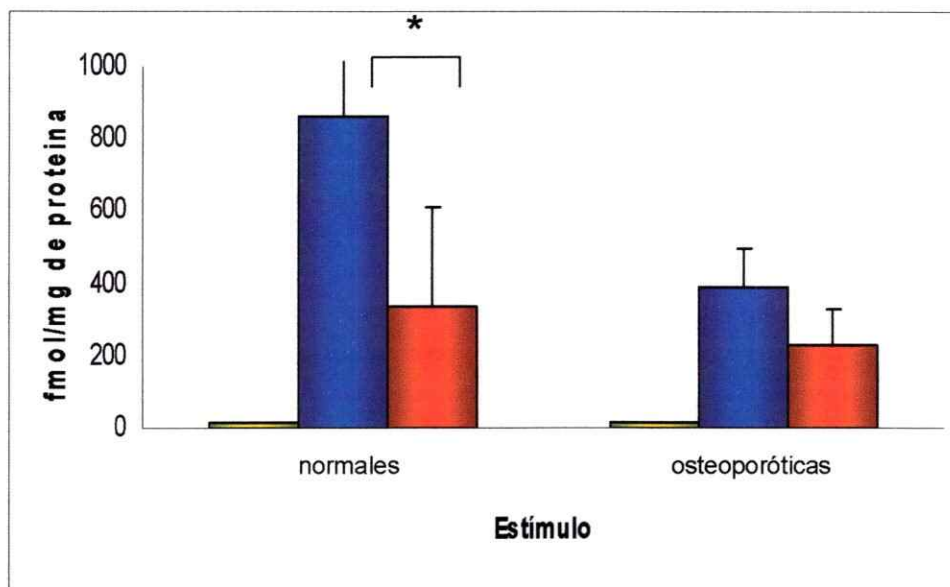


Figura 14: Medición de la actividad aromatasa medida después de 24 horas de diferenciación osteogénica (barras azules) y de diferenciación adipogénica (barras rojas) en células de donantes normales y osteoporóticas. Las barras amarillas muestran la actividad en condición basal. La Actividad se expresa en fmol/mg de proteína y corresponde al promedio \pm DE de valores medidos en duplicado de muestras obtenidas de tres donantes normales y cinco donantes osteoporóticas. * $p < 0,05$.

Efecto de Leptina sobre células de donantes normales y osteoporóticas

En células de donantes normales, la adición de leptina (200 nM) al medio de diferenciación osteogénico produce un aumento de la actividad aromatasa de 1,6 veces. En las células de pacientes osteoporóticas, la actividad aromatasa medida luego de 24 horas de estímulo osteogénico en presencia de leptina, es mayor 1,4 veces (Figura 15A). En cambio bajo el estímulo adipogénico no se aprecian diferencias en la actividad aromatasa cuando se agrega leptina en las células de donantes normales y osteoporóticas (Figura 15B).

Figura 15: Efecto de leptina en células de donantes normales y osteoporóticas.

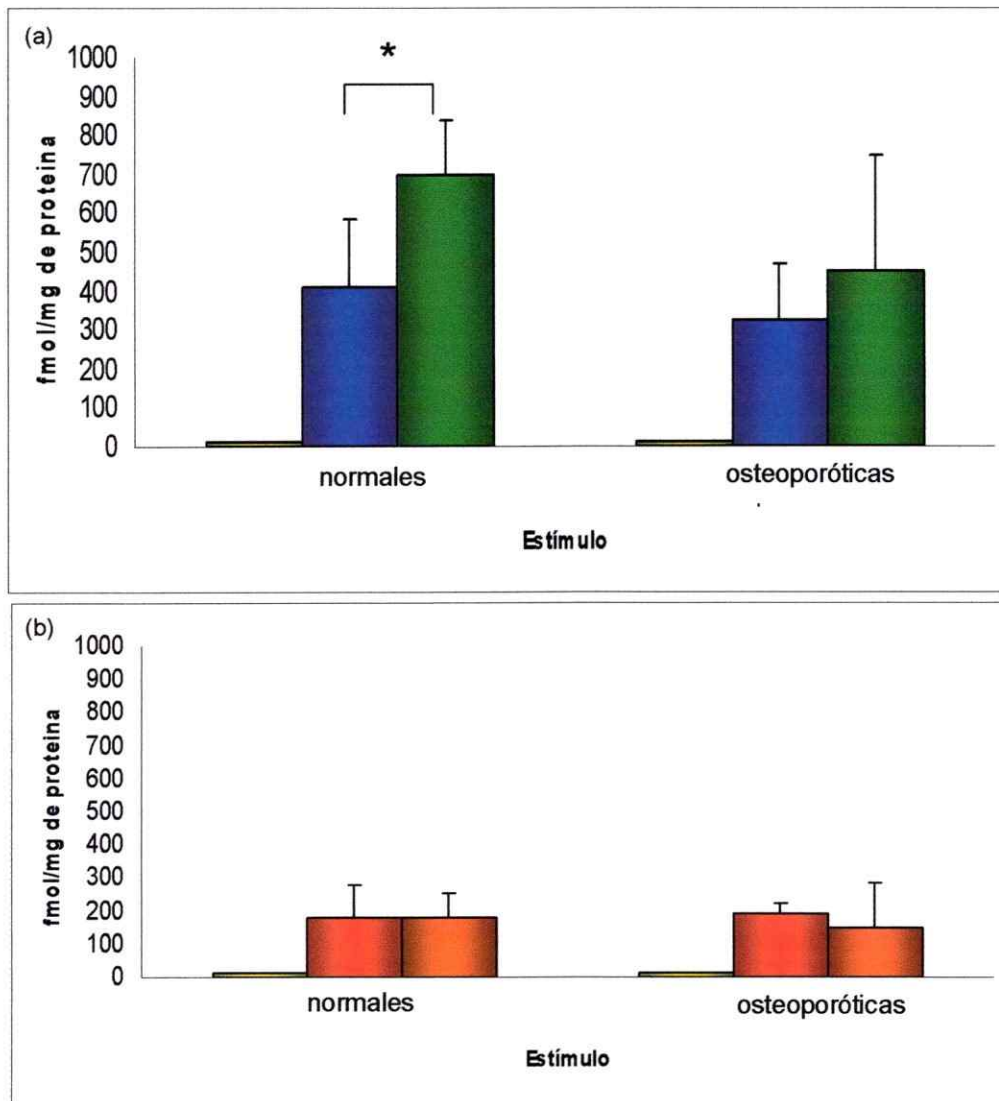


Figura 15: Medición de la actividad aromatasa medida después de 24 horas de diferenciación osteogénica (a) y adipogénico (b) en ausencia (barras azules en "a" y barras rojas en "b") y en presencia (barras verdes en "a" y barras naranjas en "b") de 200 nM de leptina, en células de donantes normales y osteoporóticas. En barras amarillas la medición en condición basal. La actividad se expresa en fmol/mg de proteína y corresponde al promedio \pm DE de valores medidos en duplicado de muestras obtenidas de tres donantes normales y cinco donantes osteoporóticas. * $p < 0,05$

Efecto de Vitamina D sobre células de donantes normales y osteoporóticos

Como se observa en la figura 16A, la actividad aromatasa de células de donantes normales sometidas a estímulo de diferenciación OS, en presencia o ausencia de vitamina D, durante 24 horas no presenta diferencias significativas. Sin embargo, cuando se agrega vitamina D a células de pacientes osteoporóticos en conjunto con el medio de diferenciación osteogénico, la actividad aromatasa es mayor que en ausencia de vitamina D (1,7 veces). Con medio AD no se aprecian diferencias significativas cuando se agrega la vitamina D en conjunto con el medio tanto para células de pacientes normales como para células de pacientes osteoporóticos (Figura 16B).

Figura 16: Efecto de vitamina D en células de donantes normales y osteoporóticas.

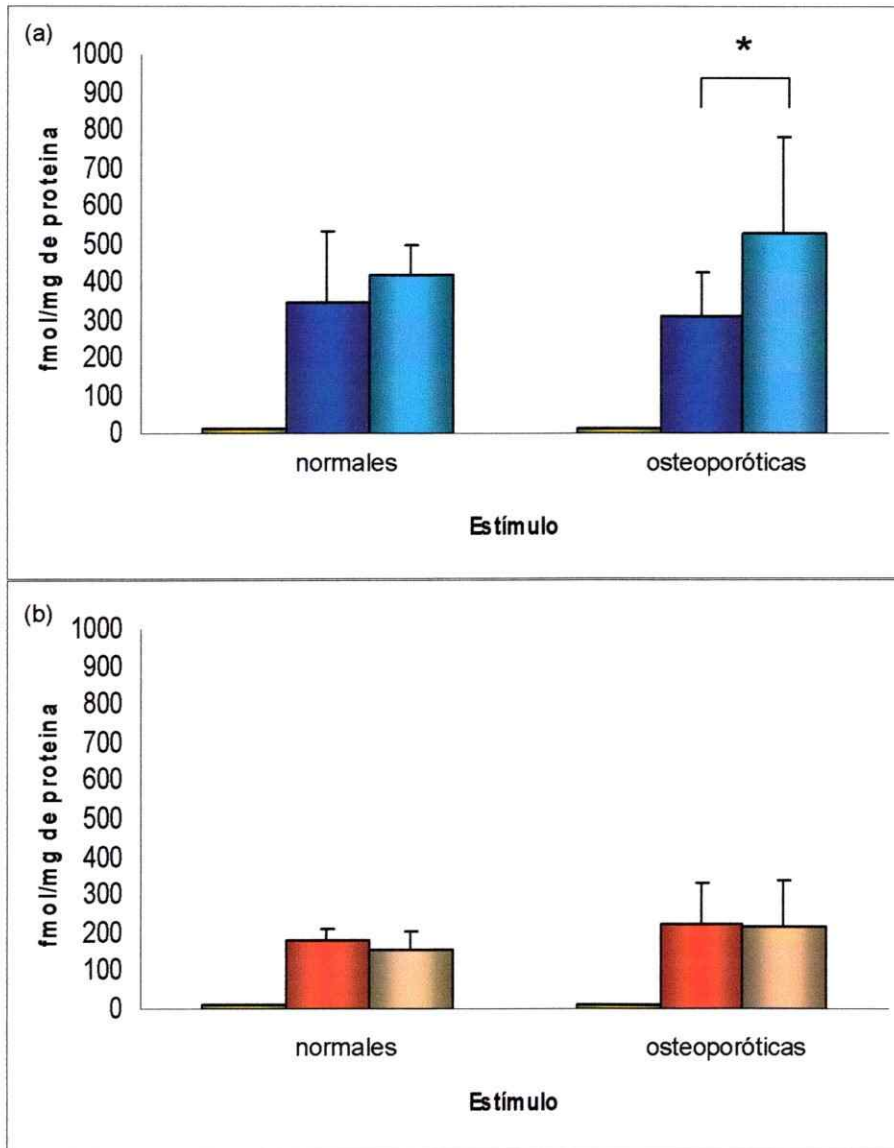


Figura 16: Medición de la actividad aromatasa medida después de 24 horas de diferenciación osteogénica (a) y adipogénica (b) en ausencia (barras azules en "a" y barras rojas en "b") y en presencia (barras calipso en "a" y barras marrones en "b") de 10 nM de vitamina D, en células de donantes normales y de donantes osteoporóticas. En barras amarillas la medición bajo condiciones basales. La actividad se expresa en fmol/mg de proteína y corresponde al promedio \pm DE de valores medidos en duplicado de muestras obtenidas de tres (normales) y cinco (osteoporóticas) donantes. * $p < 0,05$.

DISCUSIÓN

La diferenciación de las MSC's hacia osteoblastos o adipocitos está regulada por la expresión de diferentes genes asociados a estos fenotipos. En la regulación de la expresión de estos genes participan diferentes factores de carácter endocrino, paracrino, autocrino e intracrino; siendo uno de los más importantes dentro de este sistema los estrógenos. Aunque existen varios estudios que demuestran que el nivel de los estrógenos circulantes no sería muy relevante para mantener la homeostasis del hueso, se sabe que los estrógenos producidos a nivel local por la aromatización de precursores de estrógeno en células del hueso estarían participando en la regulación de la homeostasis ósea, sugiriendo que la acción local de la enzima aromatasa, responsable de la aromatización, estaría jugando un rol fundamental en la biodisponibilidad de los compuestos estrogénicos (Simpson, 2000). Se sabe que una de las causas más importantes en la patogénesis de la osteoporosis post-menopáusica es la deficiencia de estrógenos, producida por los cambios hormonales que experimenta la mujer en esta etapa de la vida. Por otra parte, el desbalance entre la producción de osteoblastos y adipocitos, en la médula ósea, es uno de los hechos característicos de la osteoporosis post-menopáusica, por lo que la regulación del compromiso de las MSC's hacia la osteogénesis o la adipogénesis, estaría jugando un rol fundamental en la mantención de la homeostasis del hueso (Parhami y col, 1999). Así, el aumento en la adipogénesis que se observa en la osteoporosis, está acompañada por una disminución de la osteogénesis. También se sabe que la diferenciación adipogénica disminuye cuando se encuentran

condiciones favorables de estrógeno, con lo cual estaría favoreciendo la osteogénesis (Dieudonne y col, 2000). Por otro lado, se sabe que los estrógenos inhiben la apoptosis de los osteoblastos e inducen la apoptosis en osteoclastos; por lo tanto, la disminución de estrógenos aumenta la resorción del hueso dejando el hueso más poroso y por ende más susceptible a fracturas (Hughes, 1996). Otro de los cambios producto de la ausencia de estrógeno es el aumento de citoquinas inflamatorias (TNF e IL-7), que producen la maduración del osteoclasto y disminuyen el tiempo de vida del osteoblasto maduro (Gilbert, 2000; Weitzmann y col, 2002). Nuestros resultados indican que durante los estadios tempranos de diferenciación las MSC's biosintetizan estrógenos tal cual lo hacen los osteoblastos diferenciados. Más aún, las diferentes capacidades de procesar estrógeno entre los adipocitos y las MSC's, sugieren que sea una señal para una diferenciación apropiada en las etapas tempranas de las células de la médula ósea.

En esta tesis demostramos que las MSC's presentan actividad aromatasa de la enzima CYP-19 y que esta muestra distintos patrones de actividad según el estímulo de diferenciación al cual fueron sometidas las células (osteogénico o adipogénico). Los parámetros cinéticos de la actividad aromatasa observados en MSC's están de acuerdo con lo visto en osteoblastos humanos, en velocidad máxima y km de androstenediona (Pino y col, 2006). Así, en células de hueso, los parámetros cinéticos indican una mayor capacidad de conversión de los andrógenos circulantes que en adipocitos y células de la piel. Cuando las MSC's son sometidas a cualquiera de estos dos estímulos se produce un aumento importante en la actividad aromatasa, el cual ocurre solo en las etapas tempranas de diferenciación

ya que, hacia el día 7 de estímulo, la actividad aromatasa decae abruptamente, aunque esta disminución nunca llegó al punto de volver a los valores basales de actividad. El aumento de la actividad aromatasa fue dos veces mayor en condiciones osteogénicas que en condiciones adipogénicas, lo que estaría sugiriendo que una mayor concentración de estrógeno induce la diferenciación osteogénica o que se requiere una mayor necesidad de estrógeno disponible en la osteogénesis que en la adipogénesis. Al analizar la forma de las curvas de actividad se puede apreciar que frente a ambos estímulos se produce un aumento temprano en la actividad, siendo mayor el aumento en la curva del estímulo osteogénico pero en un periodo de tiempo estrecho, produciéndose una caída rápida y abrupta al pasar los días. En cambio en la curva adipogénica es menor el aumento temprano pero se mantiene por un tiempo mayor, con una caída menos abrupta que en el caso osteogénico. No existen estudios previos de la actividad aromatasa en MSC's en etapas tempranas de la adipogénesis, pero se ha visto que los niveles de transcrito de *cyp 19* son mayores en las células en diferenciación que en las controles, disminuyendo con la maduración del adipocito. Es posible que el aumento de actividad mantenido por más tiempo en la diferenciación adipogénica, induzca una retroalimentación negativa de la diferenciación aumentando el nivel de estrógeno local y disminuyendo, de esta manera, la formación de adipocitos en favor de la diferenciación hacia osteoblastos.

No se sabe con exactitud cual podría ser el factor específico que produce el aumento de la actividad aromatasa durante la diferenciación osteogénica y adipogénica; sin embargo se podría especular que sea la dexametasona, que es

uno de los componentes que está presente en los dos medios de diferenciación. Esto se ve apoyado porque se ha observado que cultivos primarios de osteoblastos humanos tratados con dexametasona durante 12 horas, exhiben un aumento de la actividad aromatasa similar al reportado en esta tesis (Tanaka y col, 1996). Hay que destacar que a pesar de que en las curvas de actividad se observa que los valores de actividad decaen, siguen manteniéndose por sobre el valor basal de actividad, sugiriendo que además del efecto inicial que podría tener dexametasona, existirían otras señales de interacción desarrolladas durante el proceso de diferenciación de MSC's que puede contribuir para definir el nivel que tendría la actividad aromatasa y así mantener la actividad aromatasa por encima de los niveles basales.

En la literatura se han descrito varios agentes osteogénicos, entre los cuales están leptina y vitamina D (Gimble y col, 1995). Leptina se ha propuesto como agente protector de la osteoporosis por su conocida función osteogénica en distintas líneas celulares (Thomas y col, 1999); por su parte, la vitamina D disminuye la resorción ósea por la disminución de la hormona paratiroidea (PTH), lo que aumentaría la actividad osteoblástica (Suda y col, 2003). Además, se ha observado que en ratones la vitamina D disminuye la adipogénesis y aumenta la osteogénesis (Sato y Hiragun, 1988). Ambos agentes osteogénicos aumentaron la actividad enzimática de las MSC's bajo condiciones osteogénicas y no adipogénicas. Estos dos compuestos mostraron una respuesta dosis-dependiente y las concentraciones a las cuales se observa un efecto en la actividad aromatasa están dentro del rango de concentración fisiológica; lo cual sugiere que estos agentes podrían modular la actividad aromatasa. Así, a las 24 horas de estímulo el aumento producido por

leptina fue levemente superior que al observado con vitamina D, cuando las MSC's se cultivaban en medio osteogénico. Aunque el aumento ejercido por estos dos agentes se observa en las etapas tempranas (24 horas), también se observó que este efecto se mantiene hasta el día 7 de diferenciación, aunque no es tan significativo como el de las etapas tempranas. No se observaron aumentos o cambios significativos de actividad en condiciones basales o de diferenciación adipogénica con ninguno de los dos agentes. No existen reportes previos del efecto de leptina sobre la actividad aromatasa en células de hueso, solo hay publicados estudios de actividad aromatasa y/o expresión génica de la enzima en células de gránulos luteícos, células de estroma adiposo y la línea celular MCF-7 (Kitawaki y col, 1999; Magoffin y col, 1999; Catalana y col, 2003). Estudios reportados en la literatura y por nuestro laboratorio muestran que leptina, induce la diferenciación osteogénica en células inmortalizadas de estroma de médula ósea humana (Thomas y col, 1999) y en MSC's humanas (Hess y col, 2005), mientras que inhibe su diferenciación hacia adipocitos, sugiriendo un rol importante de leptina en el metabolismo del hueso. Esta inducción hacia la osteogénesis podría estar mediada, en parte, por el aumento de estrógeno intracelular producto de la estimulación de la actividad aromatasa producida por leptina, lo que además produciría la inhibición de la adipogénesis, y desplazaría el equilibrio osteogénesis-adipogénesis hacia la osteogénesis.

En nuestro laboratorio hemos demostrado previamente la existencia de receptores para leptina asociados a la membrana de MSC's en etapas tempranas de la diferenciación (Hess y col, 2005), como también el rol protector de leptina en el

proceso de osteogénesis. De los resultados de esta tesis se puede deducir que parte de este rol protector pudiera ser producto del efecto estimulador que tiene leptina sobre la actividad aromatasa para aumentar la formación local de estrógeno y de esta manera, regular el compromiso y diferenciación de las MSC's hacia el linaje osteogénico o adipogénico. Experimentos de nuestro laboratorio demostraron que la presencia de concentraciones fisiológicas de androstenediona, sustrato de la aromatasa, en el medio de cultivo de las MSC's, aumenta su diferenciación osteogénica y disminuye la diferenciación adipogénica (Pino y col, 2006). Este ultimo resultado junto con los anteriores, estaría sugiriendo fuertemente que el rol protector de leptina estaría siendo ejercido a través de aumentar la actividad aromatasa para inducir la osteogénesis.

Los experimentos de inmunofluorescencia no mostraron diferencias en la localización intracelular de la enzima aromatasa ni en la intensidad de la tinción, cuando las MSC's fueron cultivadas en condiciones osteogénicas, adipogénicas o basales. Las intensidades de fluorescencia observadas no explican las diferencias de actividad medidas bajo las diferentes condiciones de estímulo, lo cual es aún más evidente al analizar los western blot en las mismas condiciones. En este caso, la cantidad de la proteína aromatasa se mantiene constante en las diferentes condiciones de cultivo y por lo tanto, las diferencias observadas en la actividad enzimática no se pueden explicar por cambios en los niveles de la enzima. Una explicación para el aumento de la actividad aromatasa puede estar en una modificación post-transcripcional de la proteína. La discordancia entre los niveles de transcrito y la actividad de la aromatasa, puede ser explicada por la acción de

señales específicas de osteogénesis o adipogénesis que gatillen cambios rápidos y directos en la actividad celular de la aromatasa. Hay pocos reportes de experimentos con células aisladas, pero en células de carcinoma de mama humano se ve el mismo caso de incongruencia entre los dos análisis (actividad y cuantificación de proteínas) (Shenton, 1998).

Para el caso de la vitamina D, el aumento producido en la actividad aromatasa contrasta con el leve aumento observado en los niveles de mRNA de aromatasa (Enjuanes y col, 2003), y la mantención de los niveles de la proteína aromatasa, lo que supone un efecto regulador post-transcripcional. Este tipo de regulación post-transcripcional ha sido descrita en células tipo osteoblastos y en las líneas celulares THP-1 y JEG-3 con el inhibidor directo MEK-1/2 (Shozu y col, 2001). En nuestro caso, al utilizar el inhibidor temprano de la vía de las MAPK, PD98059, se produce una disminución de alrededor de un 80% del aumento de la actividad aromatasa observado con los distintos estímulos dados. El efecto producido por el inhibidor PD98059 sobre la actividad aromatasa, sugiere fuertemente que la regulación de la actividad aromatasa ocurriría a través de mecanismos de fosforilación y desfosforilación de la proteína.

Esta tesis es el primer estudio donde se analiza la actividad aromatasa en MSC's obtenidas de médula ósea de donantes normales y osteoporóticas. Bajo condiciones de cultivo basales y adipogénicas no se observan diferencias en la actividad aromatasa entre estos dos tipos celulares; sin embargo, esta situación cambia sustancialmente al estudiarlas bajo condiciones de diferenciación osteogénica. En estas condiciones, las células normales presentan una actividad

aromatasa mayor que las células osteoporóticas (2 veces) a las 24 horas. Esto sugiere que, aunque el medio osteogénico estimula la actividad en ambos tipos de células, lo hace de manera más atenuada en el caso de las células osteoporóticas. Esto mismo se observa cuando se agrega leptina al medio de diferenciación osteogénico. En este caso las células normales presentan un aumento mayor de actividad que las células osteoporóticas; por lo que también existiría una atenuación del efecto protector de leptina. El menor aumento de la actividad aromatasa que se observa en las células osteoporóticas respecto de las normales al estimular con medio osteogénico y leptina, no se puede saber si se debe a un menor efecto de leptina, a un menor efecto del medio osteogénico, ó a un menor efecto de ambos. Se podría sugerir que en el caso de las células de pacientes osteoporóticos, la menor actividad aromatasa observada en esta tesis esté desbalanceando el equilibrio osteogénesis-adipogénesis en la médula ósea, favoreciendo la diferenciación adipogénica. Además, el efecto de leptina sobre la actividad aromatasa también estaría disminuido, por lo que la cantidad local de estrógeno sería menor que la requerida para el compromiso de diferenciación de las MSC's hacia el linaje osteoblástico, lo que implica que la leptina no estaría ejerciendo su rol protector producido en estas células. Resultados de nuestro laboratorio (Hess y col, 2005) confirman que no existirían diferencias entre la cantidad de receptores de leptina entre ambos tipos celulares, por lo que se puede inferir que el efecto atenuador estaría ocurriendo mas adelante en la vía de señalización. Por otra parte, se ha concluido que los glucocorticoides regulan la transcripción del gen de la aromatasa en hueso, ovario y tejido adiposo (Simpson y col 1981; Purohit y col,

1992; Shimodaira y col, 1996; Shozu y Simpson, 1998; Enjuanes y col, 2003; Tanaka y col, 2006;). Sin embargo, regulaciones post-transcripcionales de la enzima por efecto de dexametasona han sido sugeridas estudiando el efecto de inhibidores de la síntesis de proteínas y de la fosforilación de la vía de las MAPK (Tanaka 1996; Shozu y col, 2001). Así, la disminución de la actividad de la enzima aromatasa, puede ser producto de cambios en la modulación durante la osteogénesis de las células de donantes osteoporóticas.

Hasta donde se sabe, este es el primer estudio de medición de la actividad aromatasa bajo condiciones de diferenciación adipogénica u osteogénica. Un estudio previo en la línea celular de ovario fetal humano (SVHFO) mostró un análisis semicuantitativo de la expresión del mRNA de aromatasa, el cual no cambió durante los estadios tardíos de diferenciación osteogénica (6 a 21 días) (Janssen y col, 1999). Además, en estudios realizados por Heim y col (2004), no se observan cambios en los niveles de transcrito de aromatasa en los primeros 7 días de diferenciación en MSC's, aunque en este caso no se midió actividad de la enzima. En ese estudio, se apreciaron aumentos de transcrito en etapas más avanzadas de la osteogénesis, lo cual está de acuerdo con los estudios que muestran un aumento de la actividad aromatasa en osteoblastos maduros. Con los resultados obtenidos en esta tesis y los publicados previamente por Heim y col (2004), se puede concluir que los mecanismos post-transcripcionales juegan un rol decisivo en la regulación de la actividad aromatasa en las etapas tempranas de la diferenciación osteogénica. Otros resultados de la literatura (Suda y col, 2003) y de nuestro laboratorio muestran que en los efectos de carácter pro-osteogénicos producidos por la vitamina D no

estaría involucrada la vía de señalización de las MAPK. De acuerdo a los resultados presentados en esta tesis, la figura 17 muestra que en MSC's obtenidas de donantes normales, leptina favorecería la fosforilación de la aromatasa, con lo cual se induciría su actividad y por consiguiente se produciría un aumento de la aromatización de andrógenos para la producción de estradiol y estrona. Este aumento de estrógenos induciría, mediante una acción autocrina, la activación de genes osteogénicos y la inhibición de genes adipogénicos. También, los estrógenos podrían difundir hacia el medio exterior ejerciendo su acción en otras células vecinas. Por otra parte, vitamina D luego de unirse a su receptor, inhibiría la acción de los genes adipogénicos. La suma de todos estos hechos, estaría ejerciendo un efecto protector en el individuo sobre la osteoporosis post-menopáusica.

Figura 17: Modelo de acción de leptina en las MSC's.

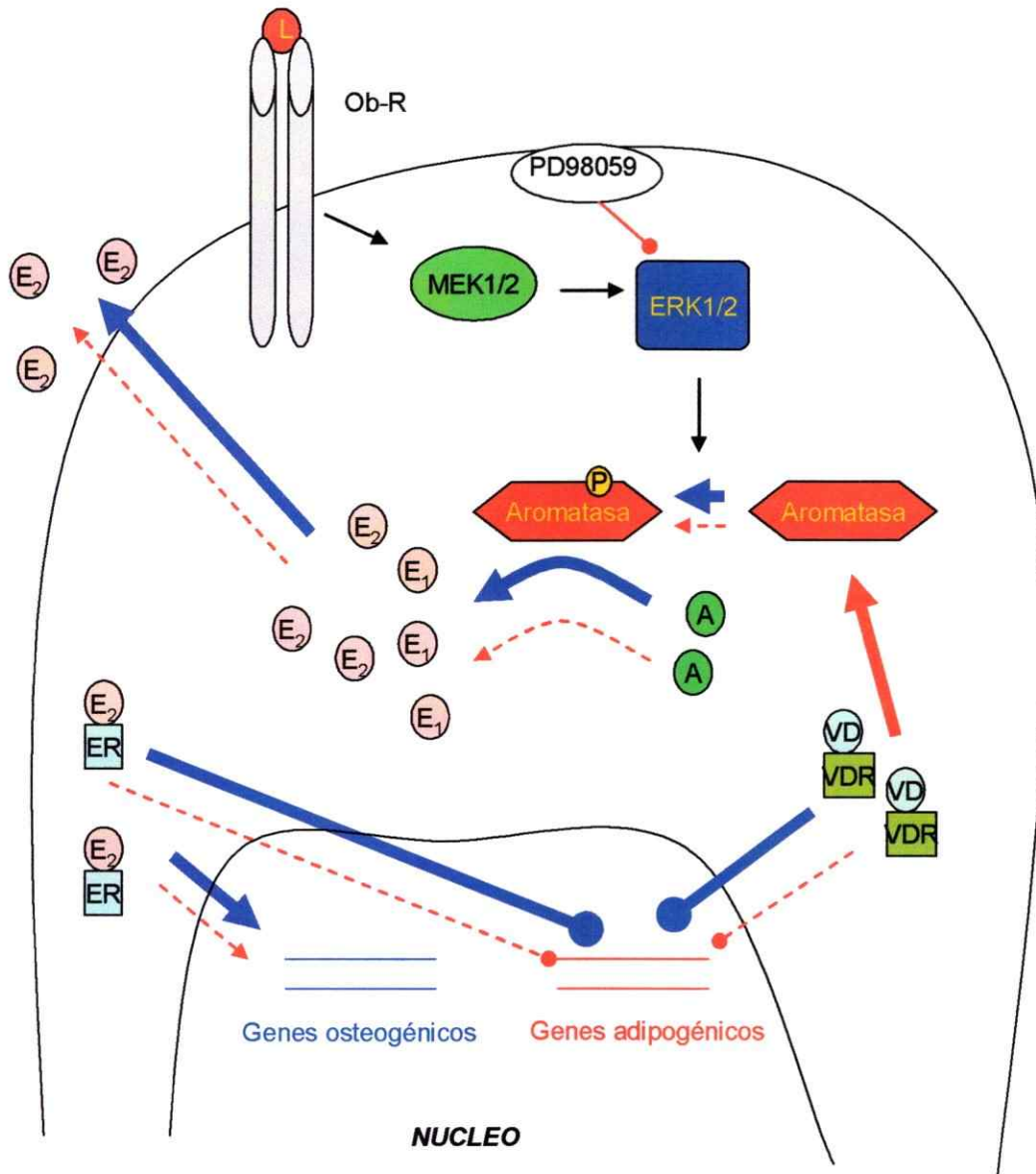


Figura 17: Modelo del efecto de leptina en células de pacientes normales y de pacientes osteoporóticos. Flechas de color azul pertenecen al paciente normal, flechas de color rojo y línea punteada pertenecen al paciente osteoporótico, flechas de color negro pertenecen a ambos. L: leptina, VD: vitamina D, P: fosfato, VDR: receptor vitamina D, A: androstenediona, E1: estrona, E2: estradiol. Flechas terminadas en punta indican estimulación y flechas terminadas en círculo indican inhibición.

En el caso de la MSC's derivadas de pacientes osteoporóticos estas inducciones estarían atenuadas, por lo que no existiría un aumento en la activación de los genes osteogénicos ni tampoco estaría ocurriendo la inhibición de los genes adipogénicos, por lo cual el aumento del compromiso hacia la vía osteogénica se desplazaría hacia el lado adipogénico, esto debido a que la producción de estradiol y estrona estaría disminuida, con lo cual el efecto inhibitor de los genes adipogénicos estaría disminuido al igual que el aumento de la activación de genes osteogénicos, con lo que se disminuye la acción autocrina de los estrógenos. Tampoco existiría la acción de los estrógenos hacia las células vecinas por que no habría tanta biodisponibilidad de estos compuestos. Para el caso de la vitamina D, estaría disminuida la inhibición de los genes adipogénicos sumado a una inducción de la actividad aromatasas, pero según los resultados de esta tesis, este efecto sería menor que el que se ve en células normales.

CONCLUSIONES

- Las MSC's presentan actividad aromatasa y ésta aumenta en la diferenciación osteogénica y adipogénica, en presencia o ausencia de leptina o vitamina D.
- El aumento de la actividad se explica por una modificación post transcripcional mas que por un aumento de la síntesis de proteína.
- La actividad aromatasa de MSC's de donantes normales es mayor que la de donantes osteoporóticos.
- Leptina y vitamina D tienen un efecto diferencial sobre la actividad aromatasa de MSC's de donantes normales y osteoporóticos.
- El rol protector que produce leptina se puede explicar en parte por el aumento que produce en la actividad aromatasa.

BIBLIOGRAFÍA

- Barr, V.A., Lane, K. y Taylor, S.I. 1999. Subcellular localization and internalization of the four human leptin receptor isoforms. *J. Biol. Chem.* **274**: 21416-21424.
- Bouillo, R., Okamura, W.H. y Norman, A.W. 1995. Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. *Endocr. Rev.* **16**:200-257.
- Caplan, A.I. 1991. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* **9**: 641-650.
- Catalano, S., Marisco, S., Giordano, C., Mauro, L., Rizza, P., Panno, M.L. y Ando, S. 2003. Leptin Enhances, via AP-1, Expression of aromatase in the MCF-7 cell line. *J. Biol. Chem.* **278**: 28668–28676.
- Chen, H., Charlat, O., Tartaglia, L.A., Wolf, E.A., Weng, X., Ellis, S.J., Lakey, N.D., Culpepper, J., Moore, K.J., Breitbar, R.E. y Duyk, G.M. 1996. The evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell.* **84**: 491-495.
- Considine, R.V., Sinha, M.K., Heiman, M.L., Krauciunas, A., Stephens, T.W., Nyce, M.R., Ohannesian, J.P., Marco, C.C., McKee, L.J., Bauer, T.L. y Caro, J.F. 1996. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Engl. J. Med.* **334**: 292-295.
- Dieudonne, M.N., Pecquery, R., Leneuve, M.C. y Giudicelli, Y. 2000. Opposite effects of androgens and estrogens on adipogenesis in rat preadipocytes: evidence for sex and site-related specificities and possible involvement of insulin-like growth factor 1 receptor and peroxisome proliferators-activated receptor γ 2. *Endocrinology.* **141**: 649-656.

- Enjuanes, A., Garcia-Giralt, N., Supervía, A., Nogués, X., Mellibovsky, L., Carbonell, J., Grinberg, D., Balcells, S. y Díez-Pérez, A. 2003. Regulation of Cyp19 gene expression in primary human osteoblasts: effects of vitamin D and other treatments. *Eur. J. Endocrinol.* **148**: 519-526.
- Ghiliardi, N., Ziegler, S., Wiestner, A., Stoffel, R., Heim, M.H. y Skoda, R.C. 1996. Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *PNAS.* **93**: 6231-6235.
- Gilbert, L. 2000. Inhibition of osteoblast differentiation by tumor necrosis factor- α . *Endocrinology.* **141**:3956–3964.
- Gimble, J.M., Morgan, C., Nelly, K., Wu, X., Dandapani, V., Wang, C.S. y Rosen, V. 1995. Bone morphogenetic proteins inhibit adipocyte differentiation by bone marrow stromal cells. *J. Cell Biochem.* **58**(3): 393-402.
- Gimble, J.M., Robinson, C.E., Wu, X. y Kelly, K.A. 1996. The function of adipocytes in the bone marrow stroma: An update. *Bone.* **19**: 421-428.
- Glasow, A., Kiess, W., Aneregg, U., Berthold, A., Bottner, A. y Kratzsch, J. 2001. Expression of leptin (Ob) and leptin receptor (Ob-R) in human fibroblasts: regulation of leptin secretion by insulin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**: 4472-4479.
- Glauber, H.S., Vollmer, W.M., Nevitt, M.C., Ensrud, K.E. y Orwoll, E.S. 1995. Body weight versus body fat distribution, adiposity and frame size as predictors of bone density. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80**: 1118-1123.
- Goulding, A. y Taylor, R.W. 1998. Plasma leptin values in relation to bone mass and density and to dynamic biochemical markers of bone resorption and formation in postmenopausal women. *Calcif. Tissue Int.* **63**(6): 456-458.

- Haynesworth, S.E., Goshima, J., Goldberg, V.M. y Caplan, A.I. 1992. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone*. **13**: 81-88.
- Heine, P.A., Taylor, J.A., Iwamoto, G.A., Lubahn, D.B. y Cooke, P.S. 2000. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor- α knockout mice. *PNAS*. **97**: 12729-12734.
- Holloway, W.R., Collier, F.M.c.L., Aitken, C.J., Myers, D.E., Hodge, J.M., Malakelis, M., Gough, T.J., Collier, G.R. y Nicholson, G.C. 2002. Leptin inhibits osteoclasto generation. *Journal of Bone and Mineral Research*. **17**: 200-209.
- Hughes, D.E. 1996. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat. Med*. **2**:1132-1136.
- Hess, R., Pino, A.M., Ríos, S., Fernández, M. y Rodríguez, J.P. 2005. High affinity leptin receptors are present in human mesenchymal stem cells (MSCs) derived from control and osteoporotic donors. *J. Cell Biochem*. **94**(1): 50-57.
- Heim, M., Frank, O., Kampmann, G., Sochocky, N., Pennimpede, T., Fuchs, P., Hunziker, W., Weber, P., Martin, I. y Bendik, I. 2004. The phytoestrogen genistein enhances osteogénesis and represses adipogenic differentiation of human primary bone marrow stromal cells. *Endocrinology*. **145**: 848-859.
- Jaiswal, N., Haynesworth, S.E., Caplan, A.I. y Bruder, S.P. 1997. Osteogenic differentiation of purified culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J. Cell Biochem*. **64**: 295-312.
- Jaiswal, R.K., Jaiswal, N., Bruder, S.P., Mbalaviele, G., Marshak, D.R. y Pittenger, M.F. 2000. Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or

adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **275**(13): 9645-9652.

Janssen, J.M.M.F., Bland, R., Hewison, M., Coughtrie, M.W.H., Sharp, S., Arts, J., Pols, H.A.P. y van Leewen, J.P.T. 1999. Estradiol formation by human osteoblasts via multiple pathways: relation with osteoblast function. *J. Cell Biochem.* **75**: 528-537.

Jilka, R.L., Hangoc, G., Girasole, G., Passeri, G., Williams, D.C., Abrams, J.S., Boyce, B., Broxmeyer, H. y Manolagas, S.C. 1992. Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science.* **257**: 88-91.

Jones, M.E.E., Thorburn, A.W., Britt, K.L., Hewitt, K.N., Misso, M.L., Wreford, N.G., Proietto, J., Oz, O.K., Leury, B.J., Robertson, K. M., Yao, S. y Simpson, E. R. 2001. Aromatase-deficient (ArKO) mice accumulate excess adipose tissue. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology.* **79**: 3-9.

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

Kelly, K.A. y Gimble, J.M. 1998. 1,25-Dihydroxy vitamin D3 inhibits adipocyte differentiation and gene expression in murine bone marrow stromal cell clones and primary cultures. *Endocrinology.* **39**(5):2622-8.

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

- Kim, G.S., Hong, J.S., Kim, S.W., Koh, J-M., An, C.S., Choi, J-Y. y Cheng, S.L. 2003. Leptin induces apoptosis via ERK/cPLA2/Cytochrome c pathway in human bone marrow stromal cells. *J. Biol. Chem.* **278**: 21920-21929.
- Kitawaki, J., Kusuki, I., Koshiba, H., Tsukamoto, K. y Honjio, H. 1999. Leptin directly stimulates aromatase activity in human luteinized granulosa cells. *Mol. Hum. Reprod.* **8**: 708-713.
- Laharrague, P., Larrouy, D., Fontanilles, A.M., Truel, N., Campfield, A., Tenenbaum, R., Galitzky, J., Corberand, J.X., Penicaud, L. y Casteilla, L. 1998. High expression of leptin by human bone marrow adipocytes. *FASEB J.* **12**: 747-752.
- Lecanda, F., Avioli, L.V. y Cheng, S.L. 1997. Regulation of bone matrix protein expression and induction of differentiation of human osteoblasts and human bone marrow stromal cells by bone morphogenetic protein-2. *J. Cell Biochem.* **67**: 386-398.
- Lee, G-H., Proenca, R., Montez, J.M., Carroll, K.M., Darvishzadeh, J.G., Lee, J.I. y Friedman, J.M. 1996. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature.* **379**: 632-635.
- Long, M.W., Robinson, J.A., Ashcraft, E.A. y Mann, K.G. 1995. Regulation of human bone marrow-derived osteoprogenitor cells by osteogenic growth factors. *J. Clin. Invest.* **95**: 881-887.
- Magoffin, D., Weitsman, S.R., Agarwal, S.K. y Jakimiuk, A.J. 1999. Leptin regulation of aromatase activity in adipose stromal cells from regularly cycling women. *Ginekol. Pol.* **70**:1-7.

- Manoalagas, S. 2000. Birth and death of bone cells: Basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrinology review*. **21**: 115-137.
- Means, G.D., Mahendroo, M., Corbin, C.J., Mathis, J.M., Powell, F.E., Mendelson, C.R. y Simpson, E.R. 1989. Structural analysis of the gene encoding human aromatasa cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **264**: 19385-19391.
- Minguell, J.J., Conget, P. y Erices, A. 2000. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **33**: 881-887.
- Nawata, H., Tanaka, S., Tanaka, S., Takayanagi, R., Dsakai, Y., Yanase, T., Ikuyama, S. y Haji, M. 1995. Aromatase in bone cells: association with osteoporosis in postmenopausal women. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **53**: 165-174.
- Nuttall, M.E., Patton, A.J., Olivera, D.L., Nadeau, D.P. y Gowen, M. 1998. Human trabecular bone cells are able to express both osteoblastic and adipocyte phenotype: Implications for osteopenic disorders. *Journal of Bone and Mineral Research.* **13**: 371-382.
- Nuttall, M.E. y Gimble, J.M. 2000. Is there a therapeutic opportunity to either prevent or treat osteopenic disorders by inhibiting marrow adipogenesis?. *Bone.* **27**: 177-184.
- Odabasi, E., Ozata, M., Turan, M., Bingol, N., Yonem, A., Fakir, B., Kutlu, M. y Ozdamir, I.C. 2000. Plasma leptin concentrations in postmenopausal women with osteoporosis. *Eur. J. Endocrinol.* **142**(2): 170-173.

- Ohlsson, C., Hellberg, N., Parini, P., Vidal, O., Bohlooly, M., Rudling, M., Lindberg, M.K., Warner, M., Angelin, B., Gustafsson, J. 2000. Obesity and disturbed lipoprotein profile in estrogen receptor α deficient male mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **278**: 640-45.
- Parhami, F., Jackson, S.M., Tintut, Y., Le, V., Bazucan, J.P., Territo, M. y Demer, L.L. 1999. Atherogenic diet and minimally oxidized low density lipoprotein inhibit osteogenic and promote adipogenic differentiation of marrow stromal cells. *Journal of Bone and Mineral Research*. **14**(12): 2067-78.
- Pino, A.M., Rodríguez, J.M., Rios, S., Astudillo, P., Leiva, L., Seitz, G., Fernandez, M. y Rodríguez, J.P. 2006. Aromatase activity of human mesenchymal stem cells is stimulated by early differentiation, vitamin D and leptin. *Journal of Endocrinology*. **191**: 715-725.
- Purohit, A., Flanagan, A.M. y Reed, M.J. 1992. Estrogen synthesis by osteoblast cell lines. *Endocrinology*. **131**: 2027-2029.
- Raiz, L.G. 1997. The osteoporosis revolution. *Ann. Intern. Med.* **126**: 458-462.
- Reseland, J.E., Syversen, U., Bakke, I., Qvigstad, G., Eide, L.G., Hjetner, O., Gordeladze, J.O. y Drevon, C.A. 2001. Leptin is expressed in and secreted from primary cultures of human osteoblasts and promotes bone mineralization. *Journal of Bone and Mineral Research*. **16**: 1462-1433.
- Rickard, D.J., Subramaniam, M. y Spelsberg, T.C. 1999. Molecular and cellular mechanisms of estrogen action on the skeleton. *J. Cell Biochem. Suppl.* **32/33**: 123-132.

Rodríguez, J.P., Montecinos, L., Ríos, S., Reyes, P. y Martínez, J. 2000. Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients produce a type I collagen-deficient extracellular matrix favoring adipogenic differentiation. *J. Cell Biochem.* **79**: 557-565.

Sato, M. y Hiragun, A. 1988. Demonstration of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 receptor-like molecule in ST 13 and 3T3 L1 preadipocytes and its inhibitory effects on preadipocyte differentiation. *J. Cell Physiol.* **135**(3):545-50.

Schutze, N., Noth, U., Schneidereit, J., Hendrich, C., Jakob, F. 2005. Differential expression of CCN-family members in primary human bone marrow-derived mesenchymal stem cells during osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiation. *Cell Communication and Signaling.* **3**(1): 5.

Shenton, K.C., Dowsett, M., Lu, Q., Brodie, A., Sasano, H., Sacks, N.P.M. y Rowlands, M.G. 1998. Comparison of biochemical aromatase activity with aromatase immunohistochemistry in human breast carcinomas. *Breast Cancer Res. Treat.* **49** Suppl 1: S101-107.

Shimodaira, K., Fujikawa, H., Okura, F., Shimizu, Y., Saito, H. y Yanaiharu, T. 1996. Osteoblast cells (MG-63 and HOS) have aromatase and 5 alpha reductase activities. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **39**: 109-116.

Shozu, M. y Simpson, E-R. 1998. Aromatase expression of human osteoblast-like cells. *Mol. Cell Endocrinol.* **139**: 117-129.

Shozu, M., Sumitani, H., Murakami, K., Segawa, T., Yang, H-J. y Inoue, M. 2001. Regulation of aromatase activity in bone derived cells: possible role of mitogen-activated protein kinase. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **79**: 61-65.

- Siegrist-Kaiser, C.A., Pauli, V., Juge-Aubry, C.E., Boss, O., Pernin, A., Chin, W.W., Cusis, I., Rohner-Jeanrenaud, F., Burger, A.G., Zapf, J. y Meier, C.A. 1997. Direct effects of leptin on brown and white adipose tissue. *J. Clin. Invest.* **100**: 2858-2864.
- Simpson, E.R. 2000. Role of aromatase in sex steroid actions. *Journal of Molecular Endocrinology.* **25**: 149-156.
- Simpson, E.R., Ackerman, G., Smith, M. y Mendelson, C. 1981. Estrogen formation in stromal cells of adipose tissue of women: Induction by glucocorticoids. *PNAS.* **78**: 5690-5694.
- Suda, T., Ueno, Y., Fujii, K. y Shinki, T. 2003. Vitamin D and Bone *Journal of Cellular Biochemistry.* **88**: 259-266.
- Takahashi, Y., Okimura, Y., Mizuno, I., Iida, K., Takahashi, T., Kaji, H., Abe, H. y Chihara, K. 1997. Leptin induce mitogen-activated protein kinase-dependent proliferation of C3H10T1/2 cells. *J. Biol. chem.* **272**: 12897-12900.
- Tanaka, S., Haji, M., Nishi, Y., Yanase, T., Takayanagi, R. y Nawata, H. 1993. Aromatase activity in human osteoblast-like osteocarcinoma cell. *Calcif. Tissue Int.* **52**: 107-109.
- Tanaka, S., Haji, M., Takayanagi, R., Sugioka, Y. y Nawata, H. 1996. 1,25-Dihydroxy vitamin D3 enhances the enzymatic activity and expression of the messenger ribonucleic acid for aromatase cytochrome P450 synergistically with dexamethasone depending on the vitamin D receptor level in cultured human osteoblasts. *Endocrinology.* **137**: 1860-1869.
- Tartaglia, L.A. 1997. The leptin receptor. *J. Biol. Chem.* **272**: 6093-6096.

- Thomas, T., Gori, F., Khosla, S., Jensen, M.D., Burguesa, B. y Riggs, B.I. 1999. Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinology*. **140**: 1630-1638.
- Thomas, T., Burguera, B., Melton, L.J. III, Atkinson, E.J., Riggs, B.L. y Khosla, S. 2000. Relationship of serum leptin levels with body composition, sex steroid and insulin levels in men and women. *Metabolism*. **49**:1278-1284.
- Thomas, T. y Burguesa, B. 2002. Is leptin the link between fat and bone mass?. *Journal of Bone and Mineral Research*. **17**: 1563-1569.
- Watts, R.G., Huang, C., Young, M.R., Li, J.J., Dong, Z., Pennie, W.D. y Colburn, N.H.1998. Expression of dominant negative Erk2 inhibits AP-1 transactivation and neoplastic transformation. *Oncogene*. **17**(26):3493-8.
- Weitzmann, M.N., Roggia, C., Toraldo, G., Weitzmann, L. y Pacifici, R. 2002. Increased production of IL-7 uncouples bone formation from bone resorption during estrogen deficiency. *J. Clin. Invest.* **110**:1643-1650.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. y Friedman, J.M.. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**:425-432.