

UCH-FC  
Biotecnología  
A 859  
C-1

OSTEO POROSIS



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

**ESTUDIO DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN Runx2 y PPAR $\gamma$  EN LAS  
CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMÁTICAS (MSCs) DURANTE LA  
OSTEOPOROSIS**

Seminario de Título

Entregado a la

Universidad de Chile

En cumplimiento parcial de los requisitos

Para optar al título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular

por

Pablo Andrés Astudillo Besnier

Julio, 2007

Santiago, Chile



Director de Tesis: Dr. Juan Pablo Rodríguez Vives

Profesor Patrocinante: Dra. María Rosa Bono



**“ESTUDIO DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN Runx2 y PPAR $\gamma$  EN LAS CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMÁTICAS (MSCs) DURANTE LA OSTEOPOROSIS”**

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

**PABLO ANDRES ASTUDILLO BESNIER**

*Dr. Juan Pablo Rodríguez Vives*  
**Director Seminario de Título**

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Rodríguez', is written over a solid horizontal line.

**Comisión de Evaluación Seminario de Título**

*Dr. Nicolás Guiliani*  
**Presidente Comisión**

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Guiliani', is written over a solid horizontal line.

*Dr. Marco Tulio Nuñez*

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

Santiago de Chile, Julio de 2007

## AGRADECIMIENTOS

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

Tampoco quiero olvidar a mis antiguos "jefes", con quienes comencé el aprendizaje de la vida de laboratorio. Gracias al Dr. Rosario Billeta, quien me recibió cuando aún era muy joven, y me ayudó a introducirme en el mundo del laboratorio y me trató siempre con un respeto y una confianza admirables. Gracias también a la Dra. María Inés Becker, quien además de maestra fue casi una amiga. Sus palabras siempre fueron de aliento hacia mi trabajo y capacidad.

Muchas personas también me acompañaron también durante estos años. Quiero agradecer a todos los amigos que he conocido. Muchos de ellos me escucharon, aconsejaron y estuvieron presentes cuando las cosas no iban bien. Nombrarlos a todos sería imposible, pero estoy muy agradecido de todos ellos. Gracias a mis eternos grupos de estudio, a los de siempre, a MkHaby, a los padres de algunos de mis amigos, por darme alojamiento y alimento en eternas noches de estudio, y a quienes fueron apoyo en algunos difíciles momentos vividos durante el transcurso de esta tesis. También quiero agradecer a todos aquellos académicos de la Facultad que tuvieron el valor de ser más que un docente, a quienes se atrevieron a ser guías y consejeros.

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



Pablo Andrés Astudillo Besnier nació el 11 de septiembre de 1980. Aquella coincidencia sería un sello distintivo de una vida llena de particularidades, de curiosidades y de pequeños entrópicos logros. Pablo creció en la pequeña ciudad de Peumo, y estudió en el Colegio El Salvador, de San Vicente de Tagua Tagua. Fue uno de los alumnos más destacados de su generación, participando activamente en diversas actividades, incluyendo concursos artísticos y literarios, aunque disfrutaba caracterizando la biodiversidad de los canales de regadío que pasaban cerca de su hogar.

Escritor, poeta y artista autodidacta, Pablo también ha participado en actividades como la edición de una revista universitaria de muy corta duración, publicaciones en revistas artísticas en internet, e incluso una participación en una exposición en conjunto con otros artistas chilenos y europeos. Pablo ha intentado participar en distintas actividades musicales, e incluso ha intentado incursionar en la actuación, caracterizando a distintas personalidades. Todo esto suena maravilloso, especialmente por ser el mismo Pablo quien escribe esta mini-biografía, pero está escrito para decir, finalmente, que Pablo Astudillo Besnier es una persona de múltiples intereses, que busca nuevas aventuras, aunque sus raíces penetran profundo en este mundo llamado ciencia.

## Índice de Contenido

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
1.	La Osteoporosis como un problema de Salud Pública	1
2.	Metabolismo óseo normal y su regulación	3
2.1.	Células Troncales Mesenquimáticas	6
2.2.	Osteogénesis y MSCs	8
2.3.	Regulación positiva del metabolismo óseo: Proteínas Morfogenéticas del Hueso	9
3.	Patogénesis de la Osteoporosis	11
3.1.	Adipogénesis y MSCs	12
3.2.	Relación entre PPAR $\gamma$ , Runx2 y el envejecimiento	13
<b>II.</b>	<b>HIPOTESIS DE TRABAJO</b>	<b>15</b>
<b>III.</b>	<b>OBJETIVOS GENERALES Y ESPECIFICOS</b>	<b>15</b>
1.	Objetivo General	15
2.	Objetivos Específicos	15
<b>IV.</b>	<b>MATERIALES Y METODOS</b>	<b>17</b>
1.	Selección de las pacientes donantes y obtención de MSCs	17
2.	Obtención y Purificación de MSCs	18
3.	Expansión de MSCs <i>in vitro</i>	19
4.	Criopreservación de MSCs	19
5.	Diferenciación Adipogénica de MSCs	20
6.	Diferenciación osteogénica de MSCs	20
7.	Inmunofluorescencia de MSCs	20
8.	Lisis Celular	21

9.	Western Blot	22
10.	Inmunoprecipitación de Runx2	23
11.	Extracción de ARN y RT-PCR	24
12.	Análisis Estadístico	26
<b>V.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>27</b>
1.	Establecimiento de cultivos de MSCs de donantes sanas y osteoporóticas	27
2.	Diferenciación Osteogénica de MSCs	28
2.1.	Expresión y localización de Runx2 en C-MSCs y O-MSCs cultivadas en condiciones osteogénicas, visualizada mediante inmunofluorescencia	28
2.2.	Cuantificación de la expresión de Runx2 mediante Western Blot	28
2.3.	Cuantificación de la abundancia relativa de <i>runx2</i> mediante RT-PCR	31
2.4.	Inmunoprecipitación y fosforilación de Runx2	34
2.5.	Expresión del marcador tardío de diferenciación osteogénica, fosfatasa alcalina ( <i>alp</i> ), mediante RT-PCR	35
3.	Diferenciación Adipogénica de MSCs	36
3.1.	Expresión y localización de PPAR $\gamma$ en C-MSCs y O-MSCs cultivadas en condiciones adipogénicas, visualizada mediante inmunofluorescencia	36
3.2.	Análisis de la expresión de PPAR $\gamma$ mediante Western Blot	36
<b>VI.</b>	<b>DISCUSION</b>	<b>40</b>
1.	Runx2, BMP-2 y Osteogénesis	41
2.	PPAR $\gamma$ y Adipogénesis	50
<b>VII.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>56</b>
<b>VIII.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>57</b>

## Índice de Tablas

Tabla 1.	Partidores utilizados para la amplificación por PCR	26
----------	-----------------------------------------------------	----

## Índice de Figuras

Figura 1.	Hueso normal y osteoporótico	2
Figura 2.	Remodelamiento óseo	4
Figura 3.	Factores que afectan el metabolismo óseo	5
Figura 4.	Plasticidad de las MSCs	7
Figura 5.	Mecanismo de acción de las BMP	10
Figura 6.	MSCs en cultivo	27
Figura 7.	Inmunofluorescencia de Runx2 en C-MSCs	29
Figura 8.	Inmunofluorescencia de Runx2 en O-MSCs	30
Figura 9.	Análisis de la expresión de Runx2 en MSCs, mediante Western Blot.	31
Figura 10.	Análisis del efecto de BMP-2 sobre Runx2.	32
Figura 11.	Expresión de <i>runx2</i> en MSCs.	33
Figura 12.	Análisis de la fosforilación de Runx2 mediante Inmunoprecipitación.	34
Figura 13.	Expresión de Fosfatasa Alcalina ( <i>alp</i> ) en MSCs.	35
Figura 14.	Inmunofluorescencia de PPAR $\gamma$ en MSCs.	37
Figura 15.	Análisis de la expresión de PPAR $\gamma$ en MSCs mediante Western Blot.	38
Figura 16.	Regulación de Runx2 en MSCs	52

## LISTA DE ABREVIATURAS

ALP	Fosfatasa Alcalina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
DMO	Densidad Mineral Ósea
BMPs	Proteínas morfogenéticas del hueso
BSA	Albúmina de suero bovino
BSP	Bone Sialoprotein
Cbfa1	Core binding factor 1
C/EBP	CCAAG Enhancer Binding Protein
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
COL	Colágeno
DAP	Dihydrodipicolinato reductasa
DEPC	Dietil Pirocarbonato
DEXA	Absorciometría de doble energía radiológica
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMEM-SF	Medio DMEM suplementado con 10% Suero Fetal Bovino
DMO	Densidad Mineral Ósea
DMSO	Dimetil Sulfóxido
dNTP	2'-deoxinucleósido 5'-trifosfato
ECL	Reacción de quimioluminiscencia
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay



ERK	Extracellular Related Kinase
GPDH	Glucosa Fosfato Deshidrogenasa
HCl	Ácido Clorhídrico
IBMX	Isobutil-metil-xantina
IMC	Índice de Masa Corporal
MA	Medio Adipogénico
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MO	Medio Osteogénico
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MSC	Células troncales (estromal) mesenquimáticas
NaOH	Hidróxido de Sodio
OC	Osteocalcina
OSX	Osterix
PAGE	Electroforesis en geles de acrilamida
PBS	Tampón fosfato salino
PPAR $\gamma$	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reverse Transcripte Polymerase Chain Reaction
Runx2	Runt-related transcription factor 2
SDS	Dodecilsulfato de Sodio
SF	Suero fetal bovino
TBS	Tampón tris salino
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta

## RESUMEN

La osteoporosis es una enfermedad en que se produce un deterioro en la arquitectura y calidad del hueso. Afecta a un tercio de la población femenina postmenopáusica y a un quinto de la población masculina. Si bien no se han dilucidado los mecanismos que influyen en el establecimiento de esta enfermedad, es característico un desbalance en el metabolismo óseo, debido a un aumento en la degradación del hueso. Además, se ha observado una disminución en su formación, asociado a un aumento en el número de adipocitos en la médula ósea, junto con una disminución en el número de osteoblastos.

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

Runx2 es esencial para la diferenciación osteogénica. Se expresa específicamente en células del linaje óseo, y su fosforilación es necesaria para su actividad en líneas celulares. Existen factores que pueden favorecer la osteogénesis, siendo uno de ellos BMP-2, el cual se ha descrito que puede unirse a receptores específicos e inducir la activación de diversas vías de transducción de señales. A su vez, PPAR $\gamma$  es esencial para la diferenciación adipogénica, y su actividad es regulada mediante fosforilación. Sin embargo, se sabe poco acerca del perfil de expresión y fosforilación de estos factores de transcripción durante la diferenciación de MSCs humanas.

Debido a la plasticidad de las MSCs, se ha propuesto una “teoría lipídica de la osteoporosis”, en que la osteoporosis se produciría por una disminución en el número de osteoblastos asociado a un aumento en la formación de adipocitos en la médula ósea de pacientes osteoporóticas.

En este Seminario de Título, se estudió el proceso de diferenciación osteogénica y adipogénica de MSCs obtenidas desde la médula ósea de mujeres postmenopáusicas sanas y osteoporóticas, con un énfasis sobre Runx2, mediante un estudio sobre su perfil de expresión y fosforilación durante la osteogénesis, y sobre el efecto que BMP-2 ejerce sobre Runx2 a nivel de transcripcional y traduccional.

Los resultados muestran que las MSCs de donantes osteoporóticas y normales expresan niveles similares de Runx2, pese a observarse diferencias a nivel transcripcional, y presentan un perfil de fosforilación y localización similar, evaluados mediante Western Blot e inmunofluorescencia, respectivamente. Además, se observó que BMP-2 no ejerce efectos significativos sobre la abundancia de Runx2, ya sea a nivel de proteína como de su localización. Sin embargo, se observó una elevada abundancia de PPAR $\gamma$  en las MSCs de donantes osteoporóticas, en condiciones de cultivo basales y de diferenciación adipogénica.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que BMP-2 no ejerce un efecto pro-osteogénico mediante una inducción directa de Runx2, y que una diferencia importante entre las MSCs de donantes sanas y osteoporóticas se debe a la elevada abundancia de PPAR $\gamma$  observada en estas últimas, la que puede ejercer un importante efecto favorecedor de la adipogénesis y determinar un aumento en la formación de adipocitos en la médula ósea de estas pacientes.

## ABSTRACT

The osteoporosis is a disease characterized by a loss of bone quality and architecture. It affects to thirty-three percent of the female postmenopausal population and twenty percent of the male population. Although the mechanisms involved in the establishment of this disease have not been explained, it is characteristic an imbalance in the bone metabolism, due to an increase in bone resorption together with a decrease in bone formation. Also, it has been observed an increase in the number of adipocytes in the bone marrow, associated with a decrease in the number of osteoblasts.

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

Runx2 is essential for osteogenic differentiation. It is expressed specifically in bone cells, and its phosphorylation is necessary for its activity in cell lines. BMP-2 is a protein that favors osteogenesis by binding to specific receptors, and inducing the activation of several signal transduction pathways. On the other hand, PPAR $\gamma$  is necessary for adipogenic differentiation, and its activity is regulated by phosphorylation. However, little is known about the expression and phosphorylation pattern of these transcriptions factors during differentiation of human MSCs.

Due to the plasticity of MSCs, it has been proposed a "lipid theory of osteoporosis", in which the pathogenesis of this disease could be explained by a decrease in the number of osteoblasts, associated with an increase in the formation of adipocytes in the bone marrow of osteoporotic patients.

In this work, we analyzed the osteogenic and adipogenic differentiation process of MSCs isolated from the bone marrow of healthy and osteoporotic postmenopausal women, with an emphasis on Runx2. In this study, we analyzed Runx2 expression and phosphorylation profile through the osteogenesis, and the effect of BMP-2 on this transcription factor at transcriptional and translational level.

The results show that MSCs from healthy and osteoporotic donors express similar levels of Runx2, despite the differences at the transcriptional level, and exhibit a similar profile of phosphorylation and localization, evaluated by western blot and immunofluorescence, respectively.

In addition, we not observed a significant effect of BMP-2 on Runx2 expression and localization. However, the results show an increased expression of PPAR $\gamma$  in the MSCs obtained from osteoporotic donors, in basal and adipogenic differentiation culture conditions.

The data presented in this work suggest that BMP-2 does not exert a pro-osteogenic effect through a direct induction of Runx2, and that the high levels of PPAR $\gamma$  observed in the cells derived from osteoporotic women is an important difference between MSCs from healthy and osteoporotic donors. This last fact may induce a positive effect on the adipogenesis, and to determine an increase in the formation of adipocytes in the bone marrow of osteoporotic patients.

## **I. INTRODUCCION**

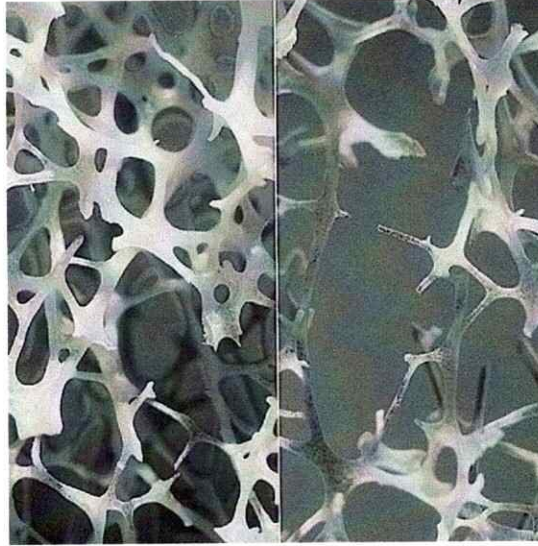
### **1. La Osteoporosis como un problema de Salud Pública**

La osteoporosis es uno de los problemas de salud pública de mayor impacto mundial, ya que afecta a aproximadamente 200 millones de personas en el mundo, principalmente a mujeres postmenopáusicas (Lin y Lane, 2004), e implica grandes costos para las entidades de salud (Morales-Torres y col., 2004).

La incidencia de esta enfermedad es variable dependiendo de la dieta y la actividad física de la población estudiada. Según las estadísticas de la IOF ("International Osteoporosis Foundation"), el 34% de las mujeres postmenopáusicas padecen esta enfermedad, aunque se presenta también en el 20% de la población masculina ([www.osteofound.org](http://www.osteofound.org)). En Chile, un estudio realizado recientemente por la Fundación Chilena de Osteoporosis (Arinoviche y col., 2006), estimó la prevalencia de esta enfermedad en 4,7% entre mujeres sobre los 20 años, y en 22% entre la población femenina postmenopáusica sobre los 50 años.

La mortalidad por efecto de las fracturas producidas por la fragilidad ósea es significativa, pudiendo alcanzar hasta un 20% después de un año tras una fractura de cadera (American College of Obstetricians and Gynecologists, 2004). Si bien en Chile no existen estudios respecto a este tema, en Argentina la mortalidad asociada a las fracturas de cadera en pacientes postmenopáusicas, durante el primer año desde la ocurrencia de la fractura, se ha estimado en un 47% (Zanchetta, 2006).

La osteoporosis se caracteriza por una pérdida de masa ósea, lo que provoca fragilidad del hueso y, por ende, un incremento en el riesgo de fracturas, especialmente de vértebras y de cadera (figura 1).



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

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

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

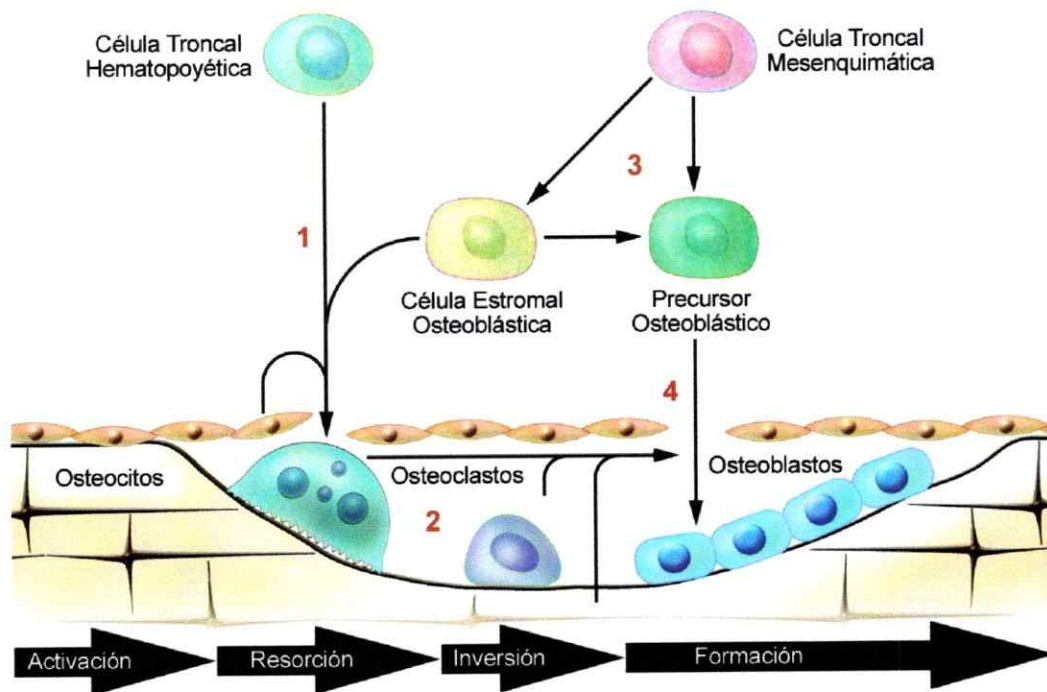
## 2. Metabolismo óseo normal y su regulación

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

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

Como se mencionó, el proceso de formación ósea se encuentra en equilibrio con el proceso de resorción ósea en condiciones normales; sin embargo, este equilibrio se encuentra alterado durante la osteoporosis. Se ha propuesto que una excesiva osteoclastogénesis, junto con una disminución en la formación de tejido óseo es responsable de la alteración de este equilibrio (Manolagas y Jilka, 1995).





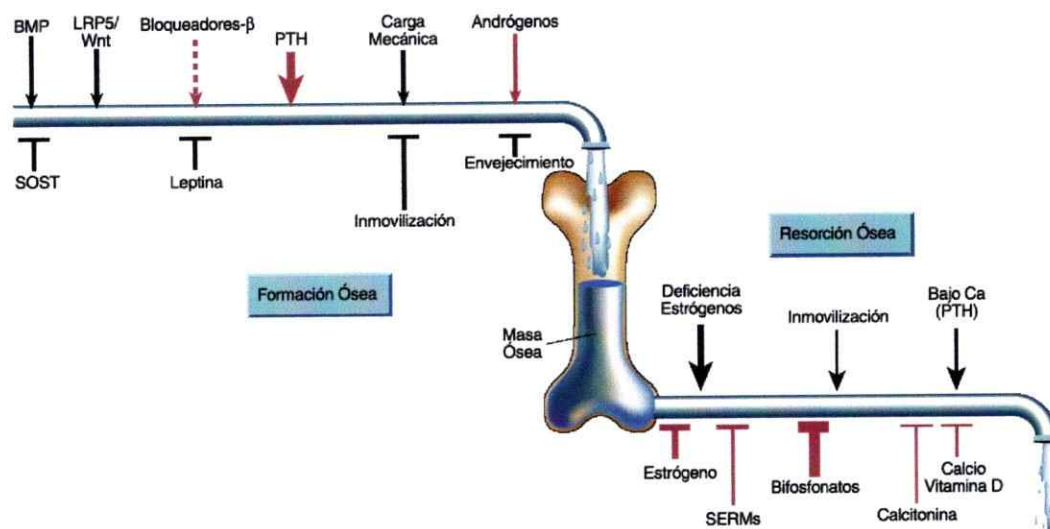
**Figura 2. Remodelamiento óseo.** El remodelamiento ocurre por la acción de células específicas; es necesaria la activación de osteoclastos, encargados de la resorción ósea, mediante la interacción de su precursor, la célula troncal hematopoyética, con células estromales osteoblásticas. La activación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

Por otra parte, observaciones histomorfométricas realizadas en pacientes osteoporóticas sugieren que este desbalance también se puede producir como consecuencia de un reemplazo de la población de células óseas funcionales por tejido adiposo (Ebeling y col., 1996; Nuttall y col., 1998).

Estudios posteriores han demostrado que el aumento del tejido adiposo observado en la médula ósea de estos pacientes ocurre a expensas de una disminución del número de células del linaje osteogénico (Nuttall y Gimble, 2000). Estos y otros estudios sugieren una relación inversa entre el tejido adiposo y los osteoblastos en la médula ósea.

Pese a estos antecedentes, la información relativa a la relación entre estos dos tipos celulares en la médula ósea, en pacientes normales u osteoporóticos, es más bien escasa. Por ende, poco se sabe acerca de las bases moleculares de la patogénesis de la osteoporosis primaria.

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



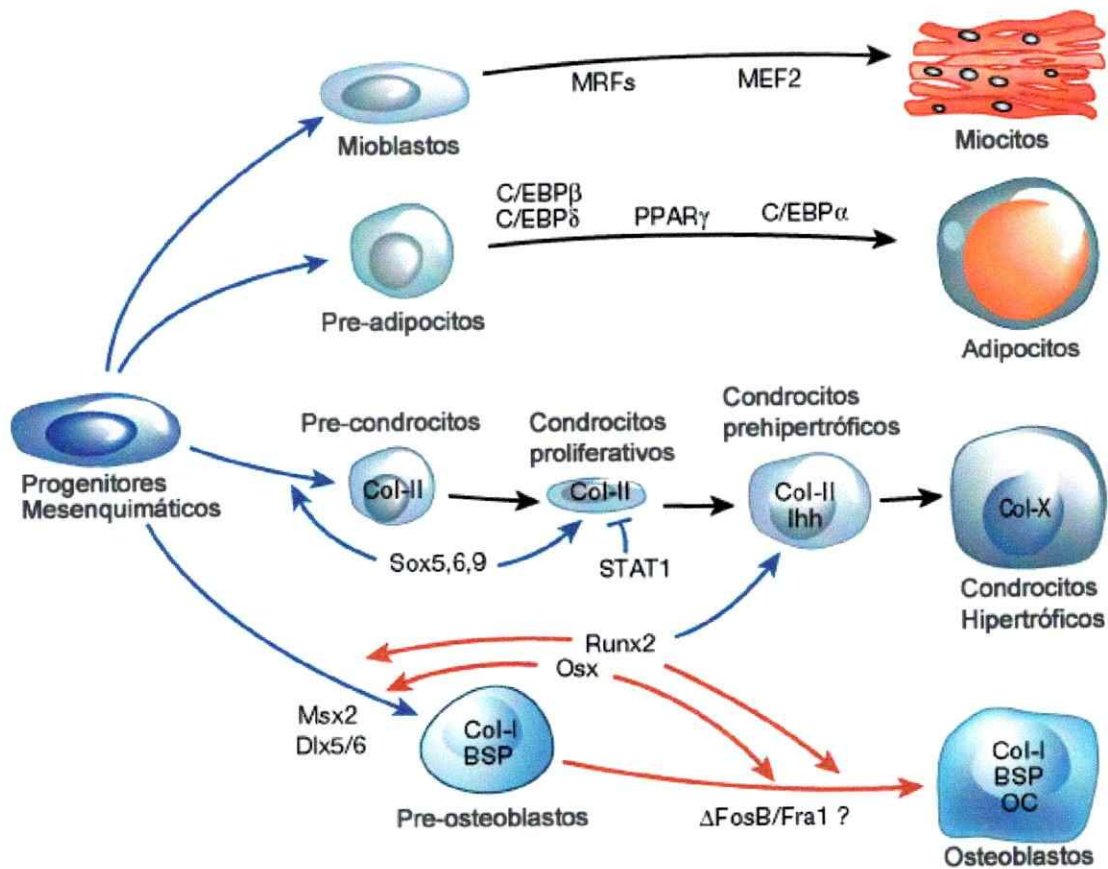
**Figura 3. Factores que afectan el metabolismo óseo.** Factores que afectan el metabolismo óseo. Existen diversos estimuladores e inhibidores fisiológicos del proceso de formación y resorción ósea (indicados con flechas negras en la figura). Además, existen estimuladores e inhibidores de origen farmacológico (indicados con flechas rojas). La formación ósea se encuentra favorecida por BMP, PTH, la carga mecánica y los andrógenos. La resorción ósea se ve aumentada por la deficiencia de estrógenos, un descenso en el nivel de calcio y por inmovilización). SOST, "sclerostin"; LRP5, "low density lipoprotein receptor related protein 5"; PTH, "parathyroid hormone"; SERM, "selective oestrogen-receptor modulator" (modificado de Harada y col., 2003).

No se ha encontrado un tratamiento efectivo para combatir esta enfermedad, y los tratamientos actuales han sido dirigidos a evitar la resorción ósea mediante el uso de agentes antiresorptivos como los bifosfonatos (Epstein y Zaidi, 2005), entre los que destacan el Risendronato (Borah y col., 2005, Mellström y col., 2004) y el Ibandronato (Chesnut III y col., 2004; Reginster y col., 2006), los que se unen a la superficie del hueso e inactivan a los osteoclastos, induciendo su muerte celular programada. Otro fármaco de reciente uso es el Teriparatide, que estimula la formación ósea (Neer y col., 2001), y corresponde a un polipéptido de origen recombinante, que contiene los primeros 34 aminoácidos de la región N-terminal de la hormona paratiroidea (por lo que es conocido también como "rh[1-34]PTH"). Sin embargo, este fármaco lleva sólo 4 años en el mercado, por lo que no se ha comprobado su efectividad a largo plazo.

## **2.1. Células Troncales Mesenquimáticas**

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

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



**Figura 4. Plasticidad de las MSCs.** Las MSCs pueden diferenciarse a distintos linajes celulares, dependiendo de la expresión de factores de transcripción específicos, como se señala en la figura; entre ellos, Runx2, específico para la diferenciación osteogénica, y PPAR $\gamma$ , específico para la diferenciación adipogénica (modificado de Harada y col., 2003).

Surge, por lo tanto, una pregunta: ¿Existe en la osteoporosis una mayor probabilidad de que las MSCs presenten una capacidad disminuida de diferenciación hacia el linaje osteogénico? Se ha demostrado que preadipocitos humanos pueden trans-diferenciarse a osteoblastos *in vivo* (Justesen y col., 2004), y que MSCs comprometidas hacia la vía osteoblastogénica pueden trans-diferenciarse y formar adipocitos (Song y Tuan, 2004). Sin embargo, no se ha descrito que exista una vía de diferenciación preferente en las MSCs osteoporóticas hacia un linaje determinado, o un posible mecanismo de regulación entre los tipos osteoblástico y adipogénico.



## 2.2. Osteogénesis y MSCs.

El proceso de diferenciación de MSCs hacia osteoblastos es regulado por factores de transcripción específicos. El más estudiado de estos factores es Runx2 (que también se conoce como Cbfa1, Osf2, AML3 y PEBP2 $\alpha$ A, siendo los dos primeros los nombres más usados en la literatura). Diversas evidencias muestran el rol fundamental que tiene Runx2 en la osteogénesis. Se ha observado que ratones *knock-out* para Runx2 no presentan tejido óseo y sólo forman cartílago (Komori y col., 1997, Otto y col., 1997). La expresión de Runx2 está restringida a tejidos óseos (Ducy y col., 1997) y su sobreexpresión puede causar osteopenia *in vivo* (Liu y col., 2001; Geoffroy y col., 2002). Además, se ha observado que la introducción de Runx2 en células no óseo-específicas induce la diferenciación osteoblástica (Nishimura y col., 2002; Zheng y col., 2004; Zhao y col., 2005), o bien la expresión de marcadores osteogénicos. Esto sugiere que Runx2 es suficiente y necesario para inducir la diferenciación osteogénica (para una revisión, refiérase a Stein y col., 2004, Lian y col., 2003).

Runx2 es regulado mediante el uso de promotores alternativos y por su estado de fosforilación. En el primer caso, se sabe que Runx2 presenta al menos dos isoformas, llamadas Runx2-I y Runx2-II. Ambas isoformas presentan la misma especificidad y capacidad transcripcional, y difieren en pocos residuos, siendo incluso casi indistinguibles mediante Western Blot (Banerjee y col., 2001). En el segundo caso, se sabe que Runx2 presenta un dominio llamado PST, rico en serinas y treoninas, que es fosforilado por distintas quinasas, y que este dominio es esencial para su actividad (Xiao y col., 2000). Sin embargo, la regulación de la actividad de Runx2 mediante fosforilación es, al menos, controversial. Algunos autores han reportado la inhibición de la actividad transcripcional de Runx2 en el estado fosforilado (Wee y col., 2002), mientras que otros autores han demostrado que la fosforilación es necesaria para que

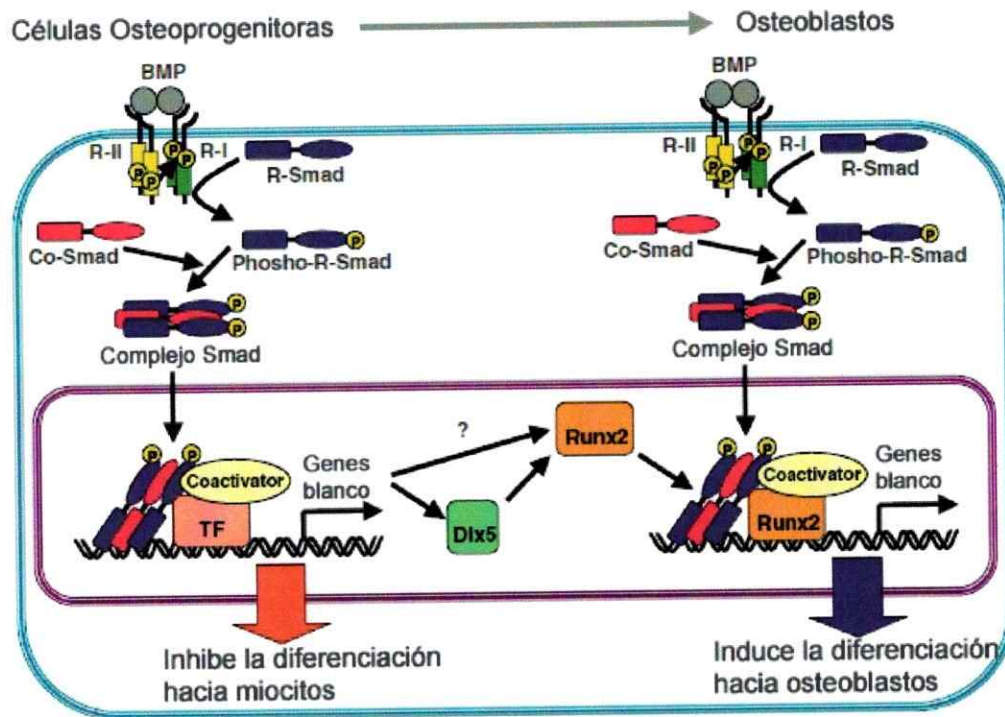
la proteína sea activa (Xiao y col., 2000; Xiao y col., 2002, Shui y col., 2003; para una revisión general sobre las vías de transducción de señales y Runx2, refiérase a Franceschi y Xiao, 2003). Considerando la información disponible, se puede deducir que no existe un mecanismo claro sobre la regulación de Runx2 mediada por fosforilación.

### **2.3. Regulación positiva del metabolismo óseo: Proteínas Morfogenéticas del Hueso.**

Las proteínas morfogenéticas de hueso (BMP, Bone Morphogenetic Protein) son miembros de la familia de las TGF- $\beta$ , las cuales juegan distintos roles en el desarrollo, regulando el crecimiento, diferenciación, apoptosis y otros procesos celulares en distintos tipos celulares (Canalis y col., 2003; Miyazono y col., 2004).

BMP-2 es un miembro de esta familia que ejerce su efecto directamente en células osteoblásticas favoreciendo la diferenciación a través de su unión a dos tipos de receptores, denominados BR-I y BR-II (Gori y col., 1999; Lee y col., 2002). El receptor BR-II transfosforila a BR-I, lo que induce la fosforilación de miembros de distintas vías de transducción de señales, siendo los más importantes las Smad 1, 5 y 8 (R-Smad), los cuales se oligomerizan con Smad4, y translocan al núcleo, donde el oligómero actúa como un factor de transcripción (figura 5) (Hassel y col., 2003; Miyazono y col., 2004).

Smad1 es la principal proteína de señalización de BMP-2 (Hoodless y col., 1996; Aubin y col., 2004); sin embargo, BMP-2 puede ejercer su efecto a través de otras vías, como p38 y JNK (Lai y Cheng, 2002; Lee y col., 2002; Nöth y col., 2003; Lee y col., 2003, Guicheux y col., 2003; Lemonnier y col., 2004).



**Figura 5. Mecanismo de acción de las BMPs.** Las BMPs se unen a su receptor tipo II, el cual transfosforila al receptor R-I. Esto activa a proteínas de la familia de las Smads, las cuales translocan al núcleo y activan la expresión de genes blanco, entre los cuales se postula a Runx2 como uno de éstos. Este proceso induce la diferenciación hacia osteoblastos (modificado de Miyazono y col., 2000)

Uno de los posibles mecanismos por el cual BMP-2 ejercería su efecto en células osteoblásticas es a través de la regulación directa sobre Runx2. En este sentido, se ha reportado que en la línea celular pluripotente, C2C12 (Lee y col., 2000) y en células humanas precursoras de médula ósea inmortalizadas (Gori y col., 1999), BMP-2 ejerce su acción a través de la inducción de este factor de transcripción.

Adicionalmente, se ha demostrado que Runx2 presenta en su secuencia peptídica un sitio de unión a Smads, llamado SMID ("Smad Interacting Domain"), alojado dentro de un dominio de destinación nuclear (NMTS, "Nuclear Matrix Targeting

Signal”), esencial para su actividad transcripcional (Afzal y col., 2004). Esta información sugiere fuertemente que Runx2 es un blanco directo de la acción de BMP-2.

### **3. Patogénesis de la Osteoporosis**

Se han propuesto diversas teorías para explicar el reemplazo del tejido óseo por tejido adiposo en el estroma de la médula ósea de las mujeres postmenopáusicas. Una de las más aceptadas se relaciona con la disminución en el nivel de estrógenos observado después de la menopausia. La deficiencia de la hormona  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) induce una pérdida de masa ósea acelerada en mujeres menopáusicas u ovariectomizadas (Horowitz, 1993; Ebeling y col., 1996). La importancia de la deficiencia de estrógenos se ve respaldada al observar una disminución de la incidencia de fracturas en mujeres mayores sometidas a terapia de reemplazo estrogénico. En este sentido, se ha propuesto que la síntesis local de estrógenos puede ejercer un efecto protector en la médula ósea, mediante la acción de la enzima aromatasa citocromo P-450. Resultados de nuestro laboratorio demuestran que esta enzima aumenta su actividad durante la diferenciación temprana de MSCs hacia el linaje osteogénico (Pino y col., 2006).

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



### 3.1. Adipogénesis y MSCs.

El proceso de diferenciación por el cual una célula precursora forma un adipocito maduro (llamado diferenciación adipogénica) ocurre por la acción conjunta de un grupo de factores de transcripción, que inducen la expresión de genes específicos mediante elementos de respuesta insertos en sus regiones promotoras. Entre estos factores de transcripción, el mejor caracterizado es PPAR $\gamma$  (de su nombre en inglés, "Peroxisome Proliferative Activated Receptor"  $\gamma$ ). Este factor es esencial para la formación de tejido adiposo *in vivo* (Rosen y col., 1999; Barak y col., 1999). Esto ha sido confirmado mediante la generación de ratones quiméricos que son haploinsuficientes para PPAR $\gamma$  (PPAR $\gamma$ <sup>+/-</sup>), los cuales no presentan tejido adiposo. También se ha demostrado que PPAR $\gamma$  es esencial para la embriogénesis, ya que ratones *knock-out* para el gen son letales durante la etapa de vascularización placentaria. PPAR $\gamma$  es, además, esencial para la diferenciación adipogénica *in vitro*. La transfección de células que no expresan PPAR $\gamma$  con una forma constitutivamente activa de la proteína, induce la diferenciación a adipocitos, así como células tratadas con activadores (ligandos) químicos de PPAR $\gamma$ , como rosiglitazona y tiazolidinediona. Por el contrario, la expresión de una forma dominante negativa de PPAR $\gamma$  impide la diferenciación hacia adipocitos. Los antecedentes señalados demuestran que PPAR $\gamma$  es necesario (y suficiente en varios modelos de estudio) para la adipogénesis (como es revisado por Lowell, 1999; Kota y col., 2005; Rangwala y col., 2000, Lee y col., 2003b).

PPAR $\gamma$  ejerce su actividad transcripcional formando un heterodímero con la proteína RXR (Retinoid X Receptor), cofactor que estabiliza a PPAR $\gamma$  impidiendo su degradación. Además, diversos estudios sugieren que PPAR $\gamma$  se vuelve inactiva cuando se fosforila en el residuo serina ubicado en la posición 112 (Hu y col., 1996;

Adams y col., 1997; Diradourian y col., 2005). Esto sugiere que la fosforilación de PPAR $\gamma$  sería un mecanismo de regulación importante de su actividad transcripcional. Además, existe un fenómeno de regulación transcripcional mediante el uso alternativo de promotores, que pueden originar al menos dos isoformas de la proteína, denominadas PPAR $\gamma$ 1 y PPAR $\gamma$ 2. Si bien no se han reportado diferencias en cuanto a la actividad transcripcional entre ambas isoformas, PPAR $\gamma$ 2 es la isoforma más estudiada, y se ha demostrado, en líneas celulares, que es la isoforma cuya expresión aumenta durante la diferenciación adipogénica (Saladin y col., 1999), mientras que PPAR $\gamma$ 1 presenta una expresión más bien constitutiva. El residuo Ser112, presente en la isoforma PPAR $\gamma$ 1, equivale al residuo Ser82 en PPAR $\gamma$ 2, por lo que la regulación post-traducciona l mediante fosforilación ocurre en ambas isoformas.

### 3.2. Relación entre PPAR $\gamma$ , Runx2 y el envejecimiento.

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

Sin embargo, existen antecedentes que sugieren que PPAR $\gamma$  puede interactuar e inhibir a Runx2. Se ha reportado la inhibición de la expresión de Runx2 y de la diferenciación osteoblástica terminal por PPAR $\gamma$  en la línea celular UAMS-33 (Lecka-Czernik y col., 1999) y en la línea celular murina MC3T3-E1 (Jeon y col., 2003, Khan y Abu-Amer, 2003), y se ha descrito este efecto *in vivo* en ratones haploinsuficientes para PPAR $\gamma$  (PPAR $\gamma$ <sup>+/-</sup>), los cuales presentan mayor masa ósea (Akune y col., 2004).



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

De acuerdo a los antecedentes entregados y con el fin de dilucidar el comportamiento de los factores de transcripción Runx2 y PPAR $\gamma$  en MSCs humanas sanas y osteoporóticas y observar una posible respuesta diferencial frente a BMP-2, nos interesó estudiar si la regulación de las vías de diferenciación osteogénica y adipogénica ocurre a nivel de los respectivos factores de transcripción involucrados en las etapas de diferenciación y si éstos se comportan de igual manera en las MSCs controles y osteoporóticas.

Considerando estas interrogantes, en esta memoria de tesis se estudió el comportamiento de Runx2 durante la osteogénesis, el efecto que BMP-2 ejerce sobre esta vía de diferenciación, y el comportamiento de PPAR $\gamma$  durante la diferenciación adipogénica, mediante inmunofluorescencia (para observar la localización intracelular de estas proteínas), Western Blot (para medir los niveles de proteína y su fosforilación) y RT-PCR (para medir la abundancia relativa del transcrito del gen *runx2*).

## **II. HIPOTESIS DE TRABAJO**

El desbalance entre las señales de diferenciación adipogénica y osteogénica en las MSCs provenientes de pacientes osteoporóticas, se puede explicar por la alteración en la expresión de los factores de transcripción específicos Runx2 y PPAR $\gamma$  o por una respuesta diferencial frente a factores externos como BMP-2.

## **III. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECIFICOS**

### **1. Objetivo General**

Estudiar la expresión de los factores de transcripción Runx2 y PPAR $\gamma$  en MSCs provenientes de donantes postmenopáusicas sanas y osteoporóticas, y analizar su perfil de expresión y comportamiento frente a BMP-2, con el fin de observar posibles diferencias en la regulación de la diferenciación de las MSCs hacia el linaje osteoblástico y adipogénico en la osteoporosis.

### **2. Objetivos Específicos**

1. Medir la expresión Runx2, en condiciones basales y durante la diferenciación osteogénica, en ausencia y presencia de BMP-2.
2. Observar la localización de Runx2, en condiciones basales y durante la diferenciación osteogénica, mediante inmunofluorescencia.
3. Medir el nivel de fosforilación de Runx2 durante la diferenciación osteogénica.
4. Medir la abundancia relativa del transcrito del gen *runx2*, mediante RT-PCR.
5. Medir la expresión basal de PPAR $\gamma$ , durante la diferenciación adipogénica.

6. Observar la localización de PPAR $\gamma$ , en condiciones basales y durante la diferenciación adipogénica, mediante Inmunofluorescencia.

#### IV. MATERIALES Y METODOS

##### 1. Selección de las pacientes donantes y obtención de MSCs

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

Todas las donantes fueron pacientes postmenopáusicas de sexo femenino, portadoras de fractura de cadera o de algún miembro inferior, que ingresaron al Servicio de Ortopedia y Traumatología del Hospital Sótero del Río, para someterse a procedimientos quirúrgicos asociados a este tipo de lesiones. Se clasificó a las donantes como normales u osteoporóticas, de acuerdo al *t score* observado en las vértebras lumbares L<sub>2</sub>-L<sub>4</sub> (escogidas porque presentan una menor probabilidad de interferencia con estructuras óseas adyacentes), que corresponde a la densidad mineral ósea (DMO) de un paciente comparado con la DMO de una población de referencia en su máximo de masa ósea (25 años). Las donantes se seleccionaron como normales si presentaban un *t score* menor a - 2,5 S.D. (es decir, presenta una DMO dentro de un rango del *t score* promedio  $\pm$  2,5 desviaciones estándar); bajo este valor, las pacientes se consideraron osteoporóticas. La DMO se determinó mediante el método de absorciometría de doble energía radiológica (DEXA), en el Laboratorio de Densitometría del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, con un densitómetro Lunar DPX-L (Software 1.3z, Lunar Corp, Madison, WI, USA). A cada una de las potenciales donantes, se le solicitó firmar un consentimiento informado donde

autorizaban la obtención de una muestra de médula ósea durante el procedimiento quirúrgico. Este procedimiento se encuentra debidamente autorizado por los comités de ética del Hospital Sótero del Río y del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile.

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

## **2. Obtención y Purificación de MSCs**

Las MSCs fueron obtenidas por aspiración de 15 a 20 ml de médula ósea desde la cresta ilíaca de las donantes, siguiendo el protocolo descrito por Jaiswal y col., 1997. En resumen, los 15 a 20 ml de aspirado se agregaron a 20 ml de Dulbecco's Modified Eagles Medium, DMEM (Sigma, St. Louis, MO, USA), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Este medio se denominará en lo sucesivo, DMEM-SF. La mezcla del aspirado de médula ósea junto al DMEM-SF se centrifugó durante 5 minutos a 1800 rpm, para coleccionar las células y descartar la capa grasa presente en la muestra. Posteriormente, las células coleccionadas se resuspendieron en 10 ml de DMEM-SF suplementados con 80 µg/ml de gentamicina (NCPC, Hebei, China) y se separaron en un gradiente de densidad de Percoll al 70% (Sigma). El gradiente se centrifugó a 1600 rpm por 15 minutos, formándose tres fracciones: la fracción superior (1,03 g/ml), la fracción media (1,10 g/ml) y la fracción inferior (1,14 g/ml). De estas tres fracciones, se coleccionó la fracción superior o de menor densidad, donde se encuentran mayoritariamente las MSCs.

La fracción recoleccionada se sometió a lavados sucesivos con DMEM-SF y se sembraron a una densidad de  $2-3 \times 10^7$  células/placa de 100 mm (Naperville, IL, USA). Éste se denomina Cultivo Primario.

### **3. Expansión de MSCs *in vitro***

Una vez que el cultivo primario ha alcanzado la confluencia, las células se liberan de la placa mediante un tratamiento con tripsina suplementada con 0,25% EDTA (Sigma), durante 5 minutos, a 37 °C. Las células fueron removidas de la placa, centrifugadas a 1800 rpm por 5 minutos, y lavadas con PBS 1X (NaCl 0,14 M; KCl 2,6 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,01 M; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,7 mM, ajustado a pH 7,2; todos los reactivos, US Biological, Swamscott, MA, USA), para luego ser resuspendidas y sembradas a una densidad de 3 x 10<sup>5</sup> células/placa de 100 mm en medio DMEM-SF. Éste constituye el primer subcultivo. Todos los experimentos presentados en esta tesis fueron realizados en el quinto subcultivo, para obtener un cultivo homogéneo de MSCs y una cantidad adecuada de células, sin comprometer su viabilidad y potencial de diferenciación.

### **4. Criopreservación de MSCs**

Una fracción de las MSCs en segundo subcultivo fueron criopreservadas para su posterior utilización. Las células se liberaron de la placa como se describió anteriormente y se resuspendieron en una mezcla de criopreservación fría, compuesta por 90% de suero fetal bovino y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma). Las MSCs son transferidas a criotubos (Nunc, Naperville, IL, USA) a una densidad de 1 x 10<sup>6</sup> células/ml y son sometidas a descenso gradual de temperatura hasta alcanzar -196 °C en nitrógeno líquido. Cabe señalar que, durante la realización de esta tesis, no se observaron diferencias en la viabilidad de MSCs frescas u obtenidas desde muestras criopreservadas.



## **5. Diferenciación Adipogénica de MSCs**

Las MSCs de donantes controles y osteoporóticas fueron sometidas a un estímulo de diferenciación adipogénica, a diferentes tiempos (entre 3 y 14 días). Para ello, las MSCs fueron lavadas dos veces con PBS 1X, y se reemplazó el medio basal DMEM-SF por medio adipogénico (MA), que está compuesto por DMEM-SF suplementado con dexametasona 1  $\mu$ M (Sigma), isobutilmetilxantina (IBMX) 100  $\mu$ g/ml (Calbiochem, San Diego, CA, USA), indometacina 100  $\mu$ M (Sigma) e insulina 10,5  $\mu$ g/ml (Novo Nordisk, Dinamarca).

## **6. Diferenciación osteogénica de MSCs**

Las MSCs fueron sometidas a un estímulo de diferenciación osteogénica, a diferentes tiempos (entre 3 y 168 horas), para lo cual se lavaron las células con PBS 1X, y se reemplazó el medio basal DMEM-SF por medio osteogénico (MO), compuesto por DMEM-SF suplementado con dexametasona 100 nM,  $\beta$ -glicerofosfato 10 mM (Sigma) y 50  $\mu$ g/ml de ácido ascórbico (Sigma). Para estudiar el efecto de BMP-2 sobre la diferenciación osteogénica, el MO se suplementó con 50 ng/ml de BMP-2 recombinante humana (Wyeth; R&D Systems).

## **7. Inmunofluorescencia de MSCs**

Las MSCs fueron sembradas sobre cubreobjetos de vidrio en placas de 24 pocillos. Tras el tratamiento respectivo, las células se lavaron dos veces con PBS 1X, y se fijaron con una solución de formaldehído al 3,7% (Sigma) en PBS 1X, durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se permeabilizaron con una solución de formaldehído al 3,7 % más Tritón X-100 al 0,2% (Merck), por 5 minutos

a temperatura ambiente. Se realizaron dos lavados con PBS 1X, y se bloqueó con una solución de BSA al 3% (Gibco BRL Life Technologies) en TBS 1X (0,14 M NaCl; 2,7 mM KCl; 25 mM Tris Base; pH 8.0, todos los reactivos US Biological), por 45 minutos. Luego del bloqueo, las células se incubaron con el anticuerpo primario específico (anti-PPAR $\gamma$  de origen ratón, diluido 1:25 en la solución de bloqueo, o anti-Runx2 de origen conejo, diluido 1:100 en la solución de bloqueo, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) durante 45 minutos a 37 °C. Se lavaron las células dos veces con PBS 1X, y se incubaron con el anticuerpo secundario respectivo, anti-ratón o anti-conejo conjugado a FITC (Rockland, PA, USA), diluido en la solución de bloqueo, durante 45 minutos a 37 °C. Se lavaron las células tres veces con PBS 1X, una vez con agua destilada, y se montaron con medio de montaje. Las preparaciones se analizaron en un microscopio de fluorescencia (Nikon Corporation, Japan) y las imágenes fueron capturadas con una cámara digital (Kodak Digital Science DC120, Rochester, NY, USA).

## **8. Lisis Celular**

Las células sometidas a diferentes tratamientos fueron lisadas de acuerdo al protocolo descrito por Lecka-Czemnick y col. (1999). Brevemente, las células fueron incubadas con amortiguador de lisis (50 mM Tris-Cl, pH 7.5; 150 mM NaCl; 1% Nonidet P-40; 0,1 % SDS; 0,5 % deoxicolato de sodio; todos los reactivos de US Biological) durante 5 minutos, y luego fueron lisadas mediante rompimiento mecánico con un Cell Scraper (Orange Scientific, Bélgica). El lisado fue centrifugado a 14500 rpm durante 15 minutos, y el sobrenadante, que contiene las proteínas, fue almacenado a -20 °C. Para la medición de PPAR $\gamma$ , el lisado se almacenó con 0,5 mM de PMSF (Sigma) y 0,5 mM

de ortovanadato de sodio (Sigma); para la medición de Runx2, adicionalmente se agregó 2  $\mu\text{g/ml}$  de leupeptina (US Biological), 1  $\mu\text{g/ml}$  de pepstatina (Sigma) y 2  $\mu\text{g/ml}$  de aprotinina (Sigma). La concentración de proteínas en los lisados celulares se midió mediante un kit de cuantificación (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

### 9. Western Blot

Se denaturó 20  $\mu\text{g}$  de lisado celular con amortiguador de carga (2% SDS, 10% glicerol, Tris 0,06 M pH 6.8, 0,01% azul de bromofenol, 20%  $\beta$ -mercaptoetanol) durante 5 minutos a 100 °C. Las proteínas fueron separadas por electroforesis en geles de acrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE; Bio-Rad). Para la separación de PPAR $\gamma$  se utilizó un gel al 8%; para la separación de Smad1, Smad1 fosforilado (en lo sucesivo, p-Smad1), Runx2 y  $\beta$ -actina, un gel al 10%. Luego, las proteínas separadas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) o PVDF (de su nombre en inglés, "Polyvinylidene fluoride"; Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA, USA), durante 1 hora a 100 V. Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 5% en TBS-Tween 0,05% o en BSA 3% en TBS-Tween 0,05% durante 1 hora e incubadas con el anticuerpo primario correspondiente durante 16 horas (dilución 1:500 del anticuerpo anti-PPAR $\gamma$ ; dilución 1:250 del anticuerpo anti-Runx2; dilución 1:1000 de los anticuerpos anti-Smad1 y anti-p-Smad1; dilución 1:5000 del anticuerpo anti- $\beta$ -actina; los anticuerpos anti-Runx2 y anti-PPAR $\gamma$  fueron adquiridos a Santa Cruz Biotechnology; los anticuerpos anti-Smad1 y anti-p-Smad1 fueron adquiridos a Upstate, y el anticuerpo anti- $\beta$ -actina, Sigma). Se realizaron tres lavados con TBS-Tween 0,05% y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a peroxidasa en dilución 1:5000 (anticuerpos anti-ratón y anti-conejo,

Rockland) durante 2 horas. Las bandas inmunoreactivas fueron visualizadas mediante un kit de quimioluminiscencia (Perkin Elmer).

Para la cuantificación de la intensidad de las bandas, se reveló las bandas inmunoreactivas utilizando películas radiográficas (membranas estándar, AGFA; membranas sensibles Hyperfilm, para revelado de PPAR $\gamma$ , Amersham Biosciences, UK). Las membranas fueron escaneadas y luego analizadas utilizando el software densitométrico Kodak Molecular Imaging Software 1D, identificando las bandas a cuantificar de acuerdo al tamaño molecular correspondiente. Se utilizó  $\beta$ -actina como control de carga.

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

#### **10. Inmunoprecipitación de Runx2**

Se sembraron  $3 \times 10^5$  células en una placa de 100 mm. Una vez alcanzada la confluencia, las células fueron diferenciadas en MO a diferentes tiempos y luego lisadas como se describió anteriormente. Se midió la concentración de proteínas de cada lisado obtenido, como se describió anteriormente. Para realizar la inmunoprecipitación de Runx2, previamente se lavó 30  $\mu$ L de Proteína A-Sefarosa (Sigma) por cada lisado a inmunoprecipitar, con 1 ml de la solución amortiguadora de lisis descrita anteriormente. Se centrifugó la mezcla durante 1 minuto a 1000 rpm, y el pellet (Proteína A-Sefarosa) se resuspendió en una mezcla de 100  $\mu$ l de la solución amortiguadora de lisis y 2  $\mu$ g de anticuerpo anti-Runx2, por cada lisado a inmunoprecipitar. Esta mezcla se incubó durante 16 horas, y se agregó posteriormente

a los lisados a inmunoprecipitar (110  $\mu$ L de mezcla para 300  $\mu$ L de lisado). El lisado con la mezcla de inmunoprecipitación se incubó por 6 horas a 4 °C y se centrifugó durante 1 minuto a 1000 rpm, para separar la mezcla de proteína A-sefarosa más el anticuerpo unido a Runx2, del resto del lisado. El sobrenadante se almacenó y el pellet se resuspendió en 25  $\mu$ L de solución amortiguadora de lisis y se agregó 25  $\mu$ L de solución amortiguadora de carga, y se resolvió en un gel de acrilamida al 8%, como se describió previamente.

Como control negativo de inmunoprecipitación, se incubó una mezcla del anticuerpo anti-Runx2 y Proteína A-Sefarosa, con solución amortiguadora de lisis que no contenía lisado celular. La cuantificación de la intensidad de las bandas se realizó como se indicó en la sección anterior. El valor obtenido para la intensidad de las bandas fue normalizado respecto a la concentración de proteínas de cada lisado utilizado para la inmunoprecipitación.

## **11. Extracción de ARN y RT-PCR**

Las células fueron sembradas en placas de 60 mm (Nunc) a una densidad de  $2 \times 10^5$  células/placa. Para la extracción, las células fueron liberadas de la placa mediante tratamiento con tripsina como se indicó anteriormente, se centrifugaron a 2050 rpm por 5 minutos y se agregó 1 ml de RNAWiz (Ambion, Austin, TX, USA). La extracción se realizó de acuerdo al protocolo del fabricante. El ARN extraído se cuantificó en un espectrofotómetro (MBE2000, Perkin Elmer, Boston, MA) y se almacenó a -80 °C (Freezer IIShin, Modelo DF 9007, Korea).

La integridad del ARN se visualizó mediante geles denaturantes de agarosa (Fermelo Biotec, Chile). Brevemente, se disolvió 0,72 g de agarosa en 45 ml de agua

DEPC; esta mezcla se dejó enfriar hasta 65 °C, y se agregó una mezcla de MOPS 10X (MOPS 0,4 M pH 7,0, Winkler Ltda., Chile; acetato de sodio 0,1 M, Winkler Ltda.; EDTA 0,01 M, Merck) y formaldehído al 37%. Las muestras de ARN (4 µL) se prepararon para la visualización en agarosa con 6 µL de agua libre de nucleasas (Mo Bio, Carlsbad, CA, USA), 9 µL de formamida (Winkler Ltda.), 3 µL de formaldehído 37%, 2 µL de MOPS 10X y 0,5 µL de bromuro de etidio (Winkler Ltda.), se denaturaron a 70 °C por 10 minutos, y se enfriaron en hielo por 2 minutos. Las muestras preparadas se corrieron durante 40 minutos a 80 V.

El ADN complementario (ADNc) se sintetizó utilizando la transcriptasa reversa M-MLV (Promega, Madison, WI, USA), mediante un ciclo de 15 minutos a 45 °C, enfriamiento en hielo por 5 minutos, y una extensión de 45 minutos a 70 °C. Para las reacciones de PCR, se amplificó 300 ng de ADNc con 30 µL de mezcla de reacción (solución amortiguadora de reacción 1X, Invitrogen; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, Invitrogen; 6 pmol de cada partidor, 22,3 µl de agua libre de nucleasas; 0,2 mM de dNTPs, Omega Bio-Tek, Doraville, GA, USA; 2,5 U de Taq polimerasa, Invitrogen). En la tabla 1 se muestra la secuencia de los partidores utilizados en este trabajo, la temperatura de denaturación (T<sub>m</sub>) y los tamaños esperados de los productos de PCR. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1,2%.

Como control positivo de la amplificación de los transcritos de los genes *runx2* y *alp*, se utilizó ARN extraído desde la línea celular SaOS. Esta línea celular fue proporcionada gentilmente por el Dr. Jorge Martínez del Laboratorio de Biología Celular, INTA.

Gen	Secuencia	Nº de ciclos	Tm (°C)	Tamaño Producto PCR (pb)
<i>runx2</i>	sentido: 5' ACCCACGAATGCACTATCC 3' antisentido: 5' TTCCATCAGCGTCAACACC 3'	39	54	330
<i>alp</i>	sentido: 5' ATCCTGTATGGCAATGGGC 3' antisentido: 5' GGCGGCAGACTTTGGTTTC 3'	37	58	484
<i>gpdh</i>	sentido: 5' ACCACAGTCCATGCCATCAC 3' antisentido: 5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3'	29	60	452

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

## 12. Análisis Estadístico

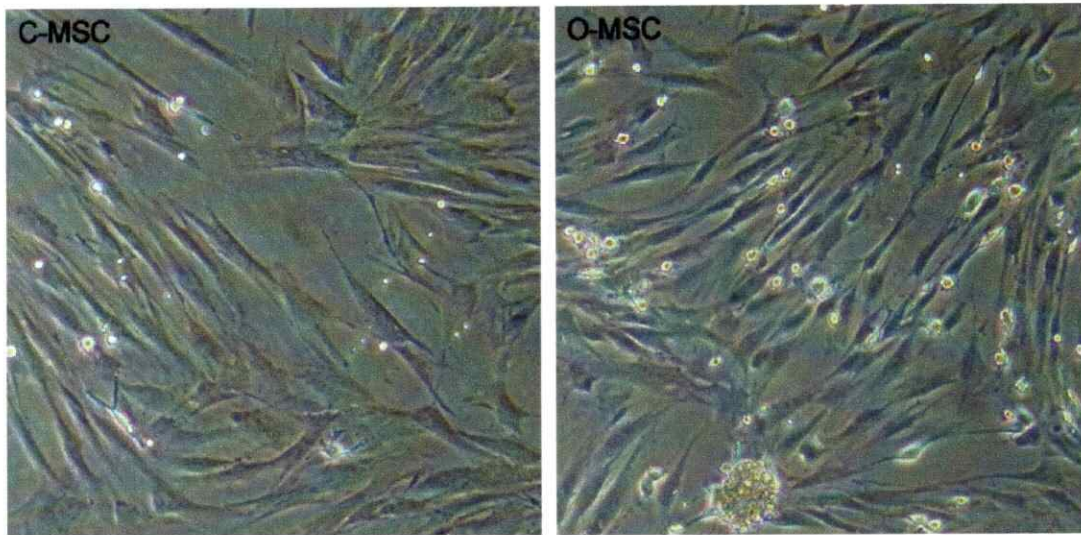
Para evaluar el efecto de la condición de las donantes (normal u osteoporótica) y del medio de cultivo, sobre la expresión de Runx2 y PPAR $\gamma$ , se realizó un Análisis de la Varianza ("ANDEVA", más conocido como "ANOVA", de sus siglas en inglés). Este análisis permite comparar los valores de distintos tratamientos (en nuestro caso donantes y medio de cultivo) y establecer si éstos son significativamente distintos. Para realizar el análisis de varianza, se utilizó el programa estadístico SYSTAT (SYSTAT Software Inc., Richmond, CA, USA).

## V. RESULTADOS

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

Para este trabajo de tesis, se utilizó células troncales mesenquimáticas de donantes postmenopáusicas, obtenidas mediante aspiración de la médula ósea, las cuales se cultivaron de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Las MSCs de donantes normales y osteoporóticas en cultivo presentaron una morfología similar, de tipo fibroblástico, siendo las células de donantes osteoporóticas, usualmente de mayor diámetro y menor longitud (figura 6).

Las células fueron subcultivadas sucesivamente hasta el quinto subcultivo, donde los cultivos presentaron un alto grado de homogeneidad, con ausencia de otros tipos celulares, a diferencia de lo que se observa en los cultivos primarios.



**Figura 6. MSCs en Cultivo.** Fotografía de contraste de fases (10X) de células troncales mesenquimáticas obtenidas de donantes sanas (C-MSC, izquierda) y de donantes osteoporóticas (O-MSC, derecha), correspondientes a un cultivo primario.



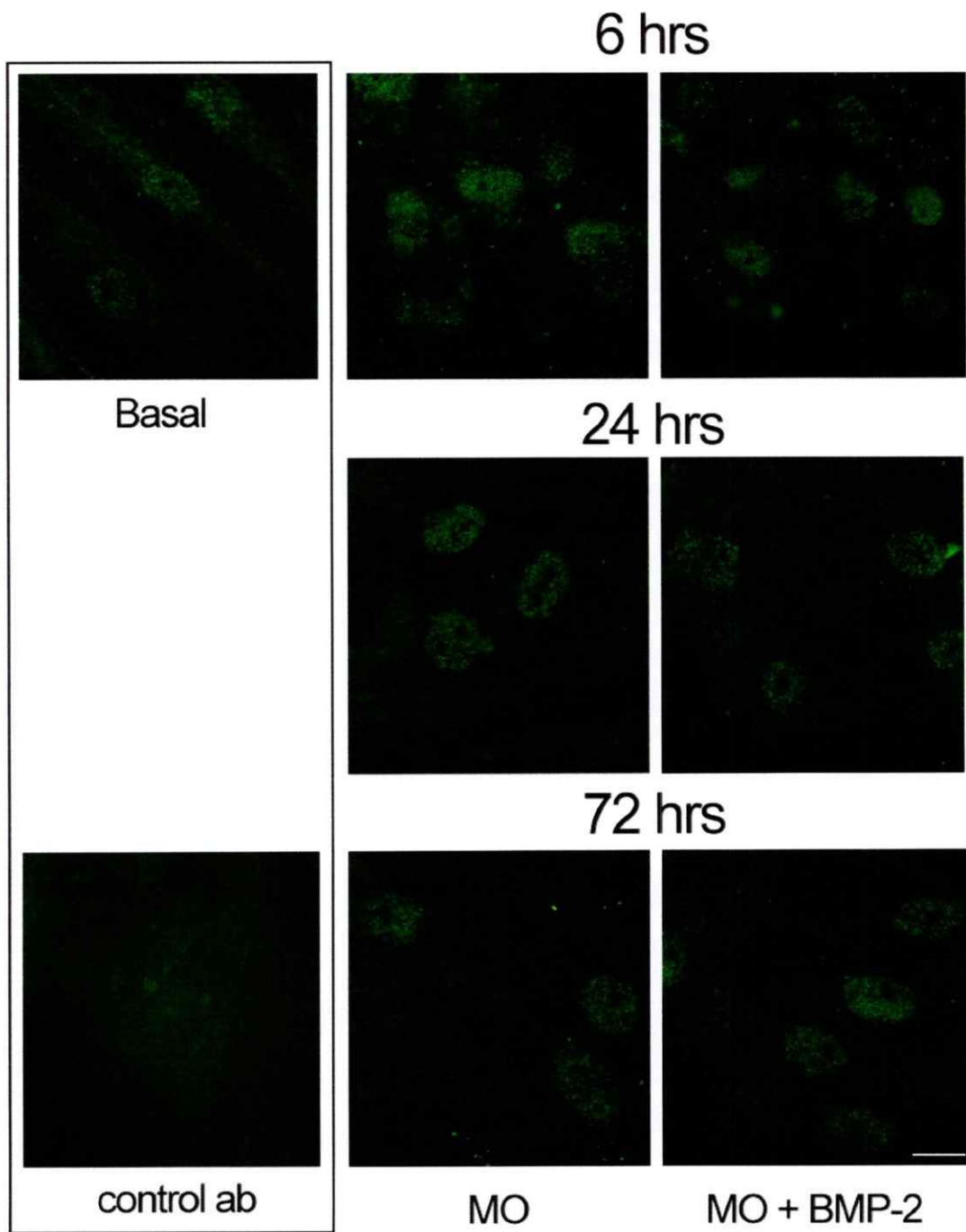
## **2. Diferenciación Osteogénica de MSCs**

### **2.1. Expresión y localización de Runx2 en C-MSCs y O-MSCs cultivadas en condiciones osteogénicas, visualizada mediante inmunofluorescencia.**

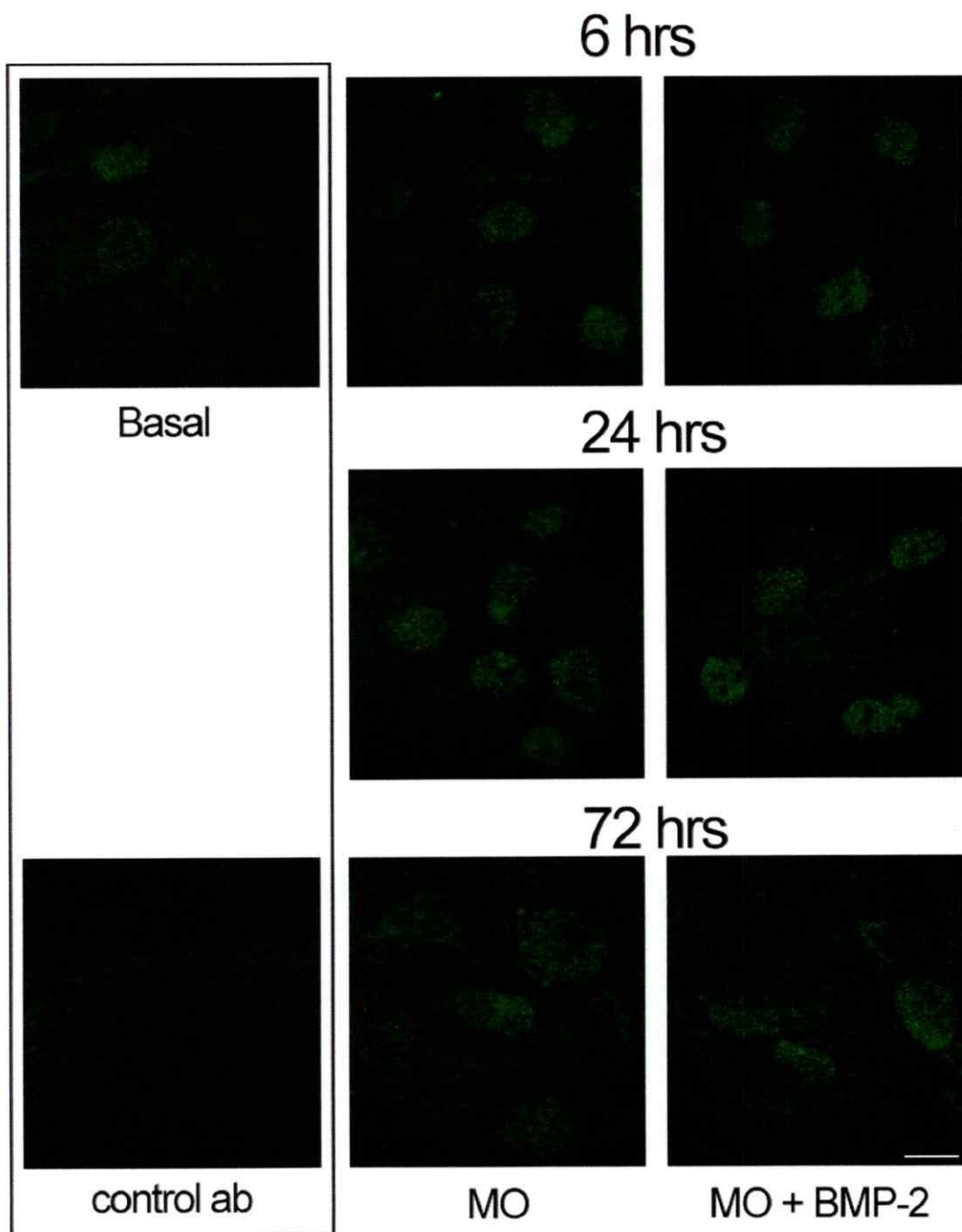
Se observó la expresión del factor de transcripción osteogénico Runx2 en MSCs de donantes normales y osteoporóticas, mediante inmunofluorescencia (figura 7 y 8, respectivamente). En condiciones basales, se observa que tanto la localización como el nivel de expresión de Runx2 son similares en MSCs obtenidas de ambos tipos de donantes. No se observó diferencias en los niveles de expresión o en la localización del factor de transcripción, al adicionar medio de diferenciación osteogénico a las MSCs de ambos tipos de donantes. Tampoco se observó diferencias durante los tiempos analizados al adicionar BMP-2 al medio de cultivo. En todos los tiempos y condiciones analizadas se observó una localización nuclear de Runx2.

### **2.2. Cuantificación de la expresión de Runx2 mediante Western Blot**

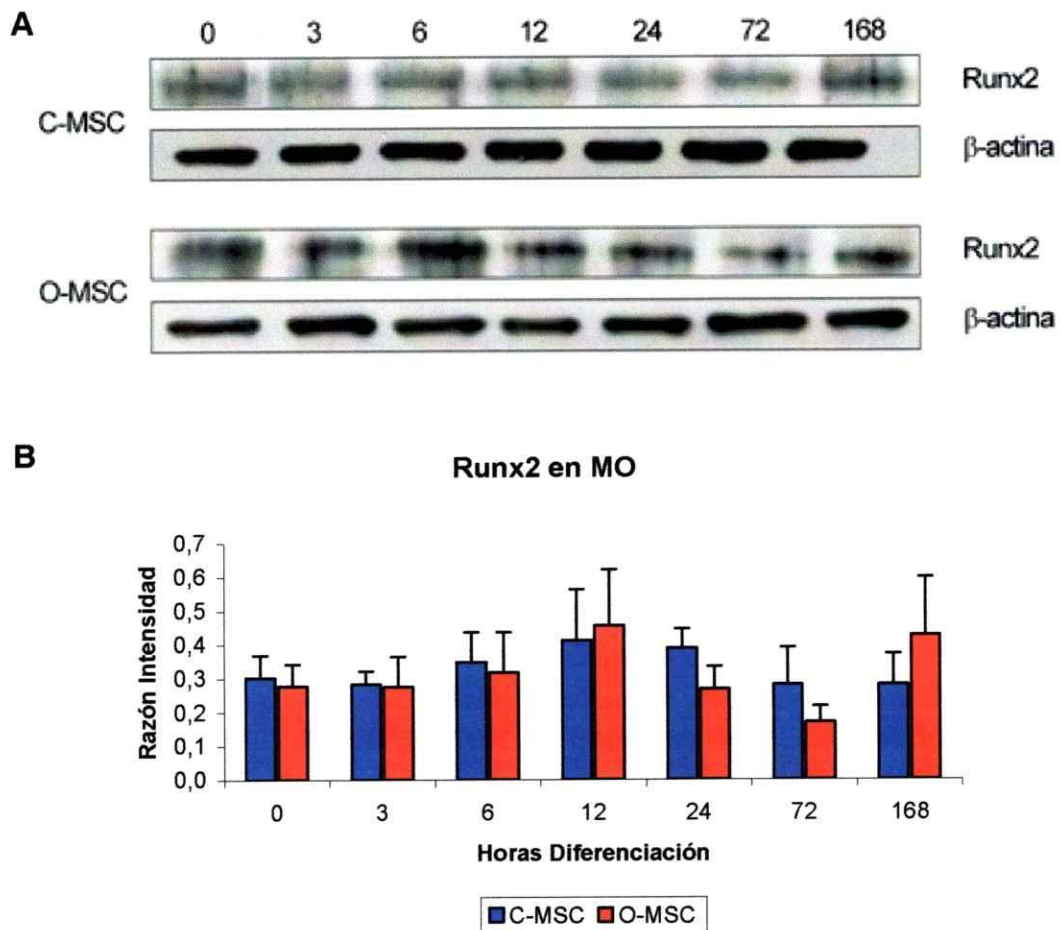
Se midió la abundancia relativa de Runx2 mediante Western Blot. En condiciones basales, tanto en las C-MSCs como en las O-MSCs se observan niveles de expresión de Runx2 similares (figura 9, A); sin embargo, el nivel de expresión de este factor exhibe un leve aumento en su abundancia, en tiempos cortos de diferenciación (entre las 3 y 12 horas de diferenciación), luego de lo cual disminuye, manteniéndose constante a un nivel similar al basal. Este aumento a tiempos tempranos de diferenciación se observa en ambos tipos de muestras (figura 9, B). Al adicionar BMP-2 al medio de diferenciación osteogénico, no se observa un aumento en la expresión de Runx2 en los dos tipos de muestras analizadas (figura 10, A y B).



**Figura 7. Inmunofluorescencia de Runx2 en C-MSCs.** Visualización de la localización de Runx2 mediante inmunofluorescencia en células troncales mesenquimáticas normales. Control ab, control sin anticuerpo primario; MO, medio osteogénico; MO+BMP-2, medio osteogénico con BMP-2. Barra = 10  $\mu$ m.



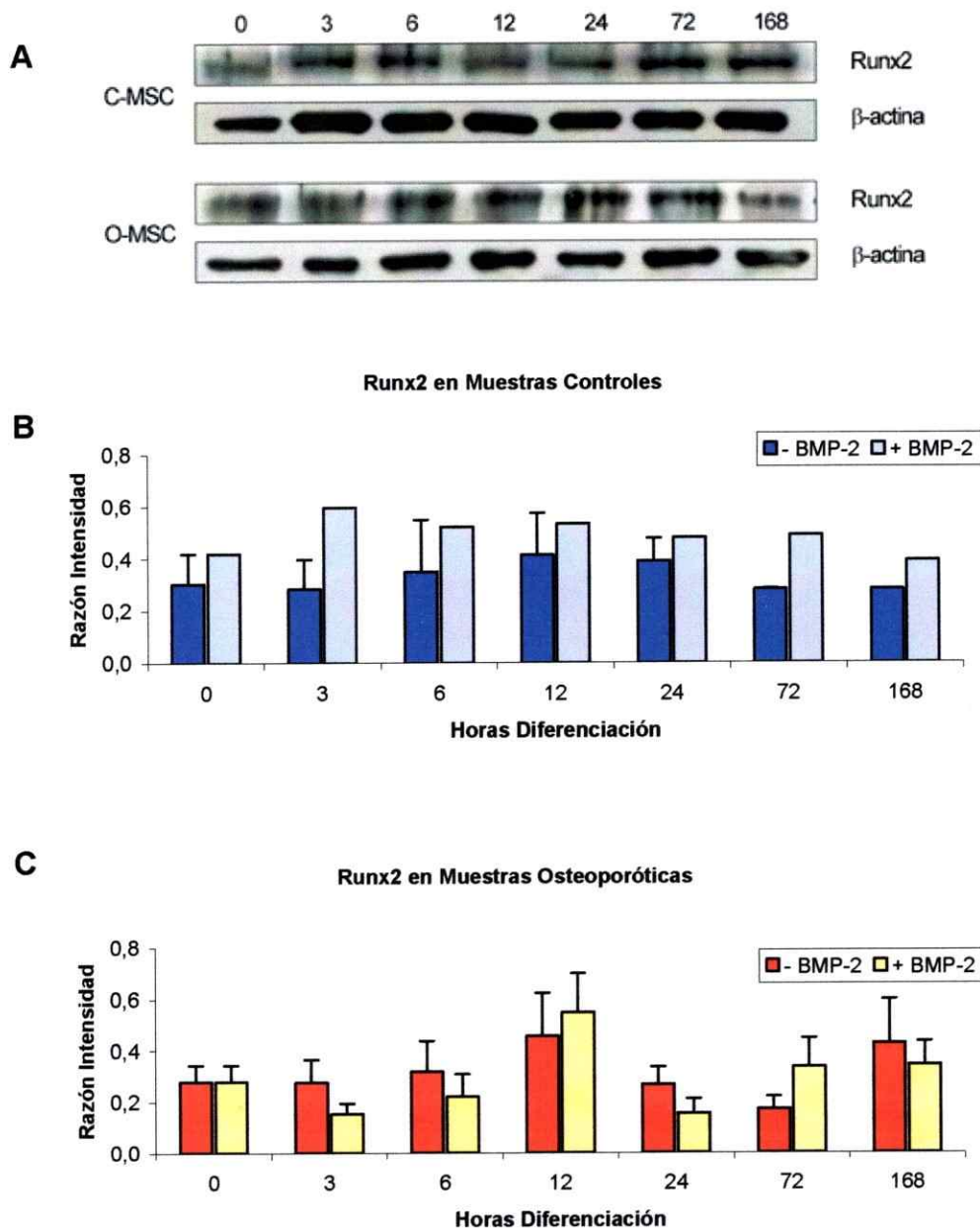
**Figura 8. Inmunofluorescencia de Runx2 en O-MSCs.** Visualización de la localización de Runx2 mediante inmunofluorescencia en células troncales mesenquimáticas osteoporóticas. Control ab, control sin anticuerpo primario; MO, medio osteogénico; MO+BMP-2, medio osteogénico con BMP-2. Barra = 10  $\mu$ m.



**Figura 9. Análisis de la expresión de Runx2 en MSCs, mediante Western Blot. (A)** Western Blots representativo de una muestra control (C-MSC, n=2) y de una muestra osteoporótica (O-MSC, n=4). Se normalizó por la intensidad de  $\beta$ -actina. **(B)** Abundancia relativa de Runx2 en C-MSC (barras azules) y O-MSC (barras rojas), en medio osteogénico. Los datos son expresados como promedio  $\pm$  error estándar.

### 2.3. Cuantificación de la abundancia relativa de *runx2* mediante RT-PCR

Para evaluar si existen diferencias en la abundancia relativa de *runx2* entre C-MSCs y O-MSCs a nivel transcripcional, se determinó la expresión del transcrito mediante RT-PCR. Las células fueron diferenciadas durante los tiempos descritos, realizándose la correspondiente extracción de ARN y síntesis de ADN complementario.

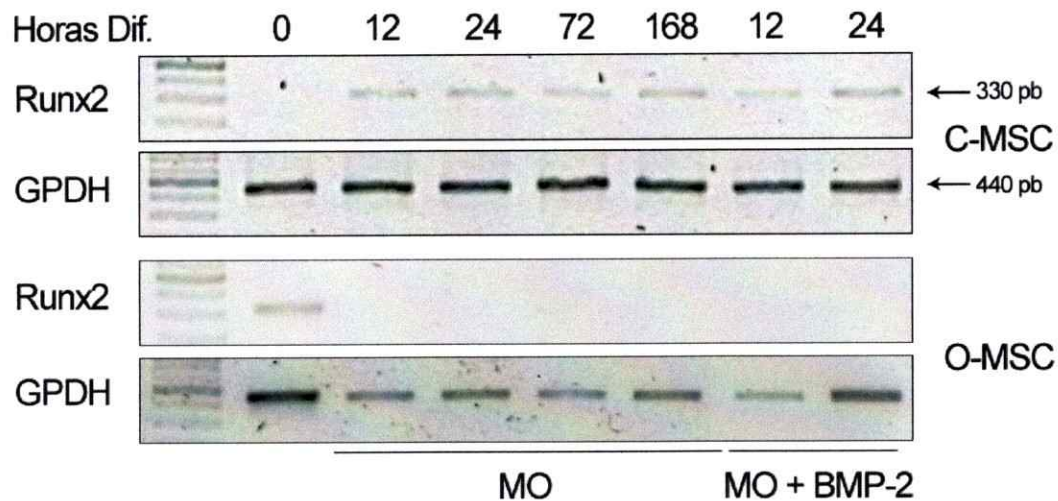


**Figura 10. Análisis del efecto de BMP-2 sobre Runx2.** (A) Efecto de BMP-2 sobre la expresión de Runx2 en células troncales mesenquimáticas, mediante Western Blot. (B) Efecto de BMP-2 sobre Runx2 en C-MSCs. Se midió Runx2 en los tiempos señalados, en medio osteogénico en ausencia de BMP-2 (barras azules, n=2) y en presencia de 50 ng/mL de BMP-2 (barras celestes, n=1). (C) Efecto de BMP-2 sobre Runx2 en O-MSCs. Se midió Runx2 en los tiempos señalados, en medio osteogénico en ausencia de BMP-2 (barras rojas, n=3) y en presencia de 50 ng/mL de BMP-2 (barras amarillas, n=3). Los datos son expresados como promedio  $\pm$  error estándar.



La figura 11 muestra el perfil de expresión de *runx2* mediante RT-PCR convencional. En las C-MSCs se observa una baja abundancia del transcrito de *runx2*, desde tiempos muy tempranos de diferenciación (12 horas) hasta tiempos más largos, (7 días). Al adicionar BMP-2 al medio de diferenciación osteogénico, no se observa un aumento en la abundancia relativa de transcrito en las C-MSCs, a las 12 y 24 horas de diferenciación, respecto al medio osteogénico sin BMP-2 (figura 11). La eficiencia de amplificación de los partidores utilizados se comprobó mediante la amplificación de *runx2* utilizando como sustrato ADNc obtenidos de la línea celular pre-osteoblástica SaOS.

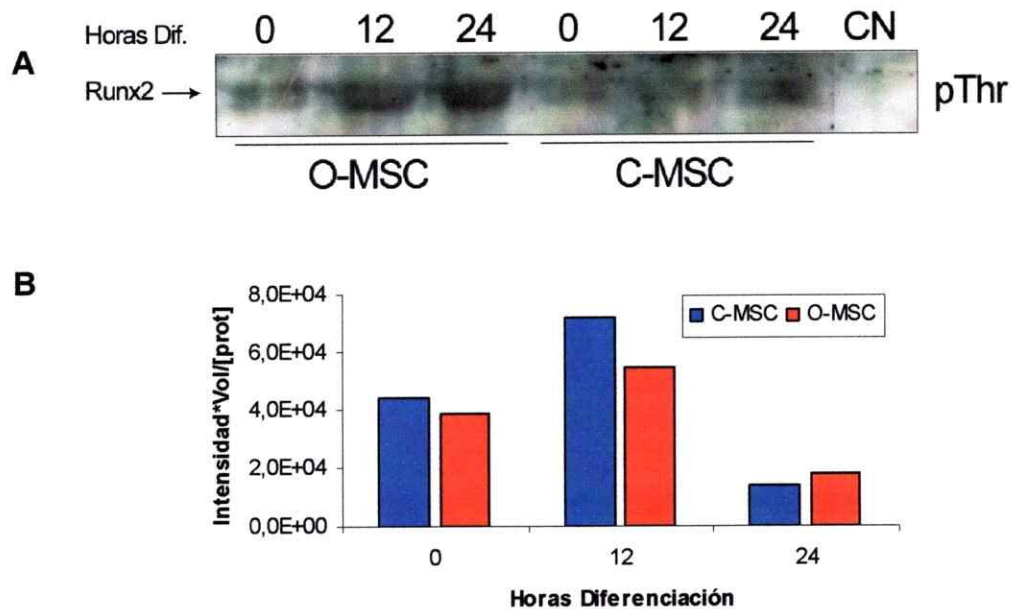
Al medir la expresión de *runx2* en las O-MSCs, no se observa amplificación del transcrito. La adición de BMP-2 no induce un aumento en la abundancia relativa de *runx2*, ya que no se observa amplificación de Runx2 en las O-MSCs tratadas.



**Figura 11. Expresión de *runx2* en MSCs.** Expresión de *runx2* en MSCs, mediante RT-PCR, en muestras controles (C-MSC) y osteoporóticas (O-MSC), utilizando los partidores señalados en la Tabla 1. Se midió *runx2* en los tiempos señalados, en medio osteogénico (MO) en ausencia de BMP-2 y en presencia de 50 ng/mL de BMP-2 (MO + BMP-2). Se señalan los tamaños de las bandas de *runx2* (330 pares de bases, pb) y GPDH (440 pb).

## 2.4. Inmunoprecipitación y fosforilación de Runx2.

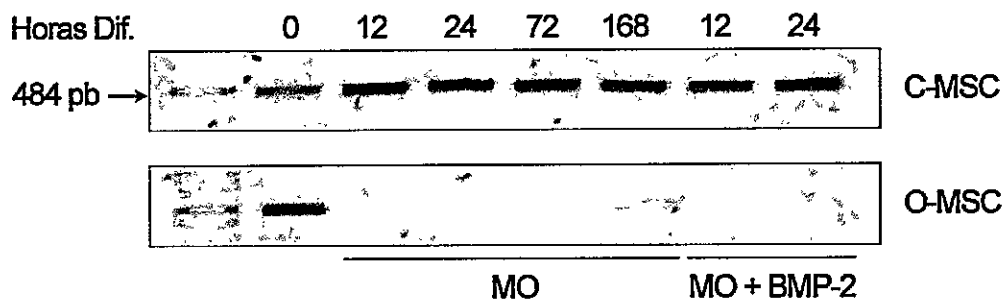
Se determinó el nivel de fosforilación de Runx2 utilizando un anticuerpo anti-fosfotreonina (anti-pThr). Para ello, se inmunoprecipitaron lisados de C-MSCs y O-MSCs cultivados en condiciones basales y en medio osteogénico durante 12 y 24 horas de diferenciación, como se señaló previamente. Se observó que, en condiciones basales, el grado de fosforilación es similar en ambos tipos de muestras (figura 12, B). A las 12 horas de diferenciación, se observa un incremento en el grado de fosforilación de un 60% en la C-MSCs y de un 40% en la O-MSCs, respecto a la condición basal. En ambos tipos de muestras, el grado de fosforilación disminuye abruptamente a las 24 horas de diferenciación.



**Figura 12. Análisis de la fosforilación de Runx2 mediante Inmunoprecipitación.** (A) Inmunoprecipitación de Runx2. CN, control negativo (Proteína A-Sefarosa + solución amortiguadora de lisis y anticuerpo); Horas Dif., horas de diferenciación. (B) Normalización de la intensidad medida por análisis densitométrico, por la concentración de proteína ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), en C-MSC (barras azules) y O-MSC (barras rojas).

## 2.5. Expresión del marcador tardío de diferenciación osteogénica, fosfatasa alcalina (*alp*), mediante RT-PCR.

Para estimar el grado de diferenciación en los experimentos realizados, se evaluó la abundancia relativa de genes correspondientes a marcadores de diferenciación. Para evaluar el grado de diferenciación osteogénica, se midió la expresión del gen *alp*, codificante para fosfatasa alcalina, en C-MSCs y O-MSCs durante los tiempos evaluados anteriormente (0 a 168 horas), en ausencia y presencia de BMP-2 (figura 13). Se observó la expresión de *alp* sólo en las C-MSCs, desde las 12 horas. La adición de BMP-2 al medio osteogénico induce un aumento en la abundancia relativa del transcrito del gen *alp* en los tiempos evaluados. Se observa una baja abundancia relativa del transcrito de este gen en las O-MSCs, a partir de las 72 horas de diferenciación (figura 13), mientras que la adición de BMP-2 induce un aumento en la abundancia relativa del transcrito del gen *alp* a partir de las 24 horas de diferenciación.



**Figura 13. Expresión de fosfatasa alcalina (*alp*) en MSCs.** Se midió la abundancia relativa del ARN mensajero del gen *alp*, mediante RT-PCR, en muestras controles (C-MSC) y osteoporóticas (O-MSC). Se midió *alp* en los tiempos señalados (horas de diferenciación), en medio osteogénico en ausencia y presencia de 50 ng/mL de BMP-2. Se indica la banda de 484 pares de bases (pb), correspondiente a *alp*.



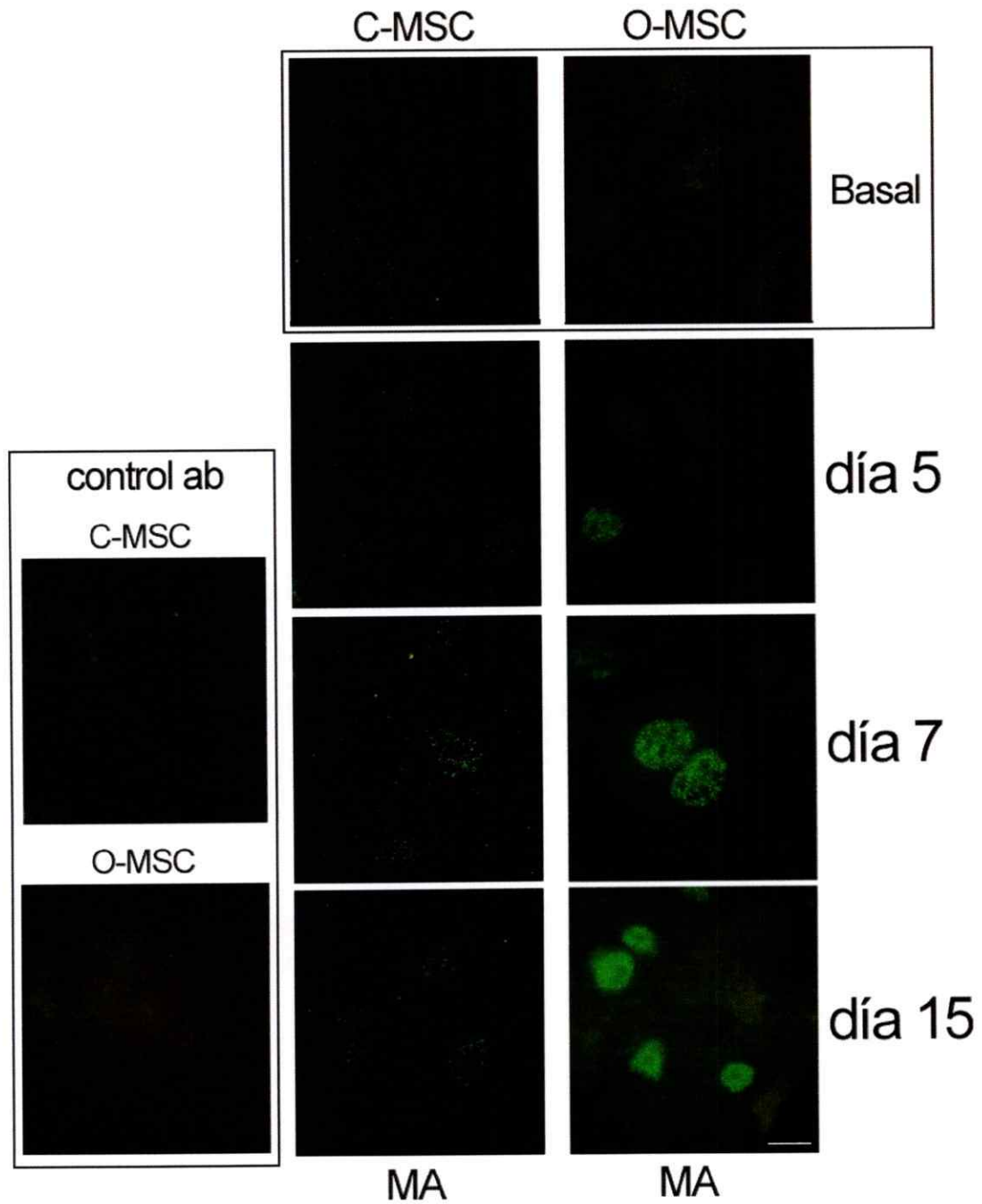
### **3. Diferenciación Adipogénica de MSCs**

#### **3.1. Expresión y localización de PPAR $\gamma$ en C-MSCs y O-MSCs cultivadas en condiciones adipogénicas, visualizada mediante inmunofluorescencia**

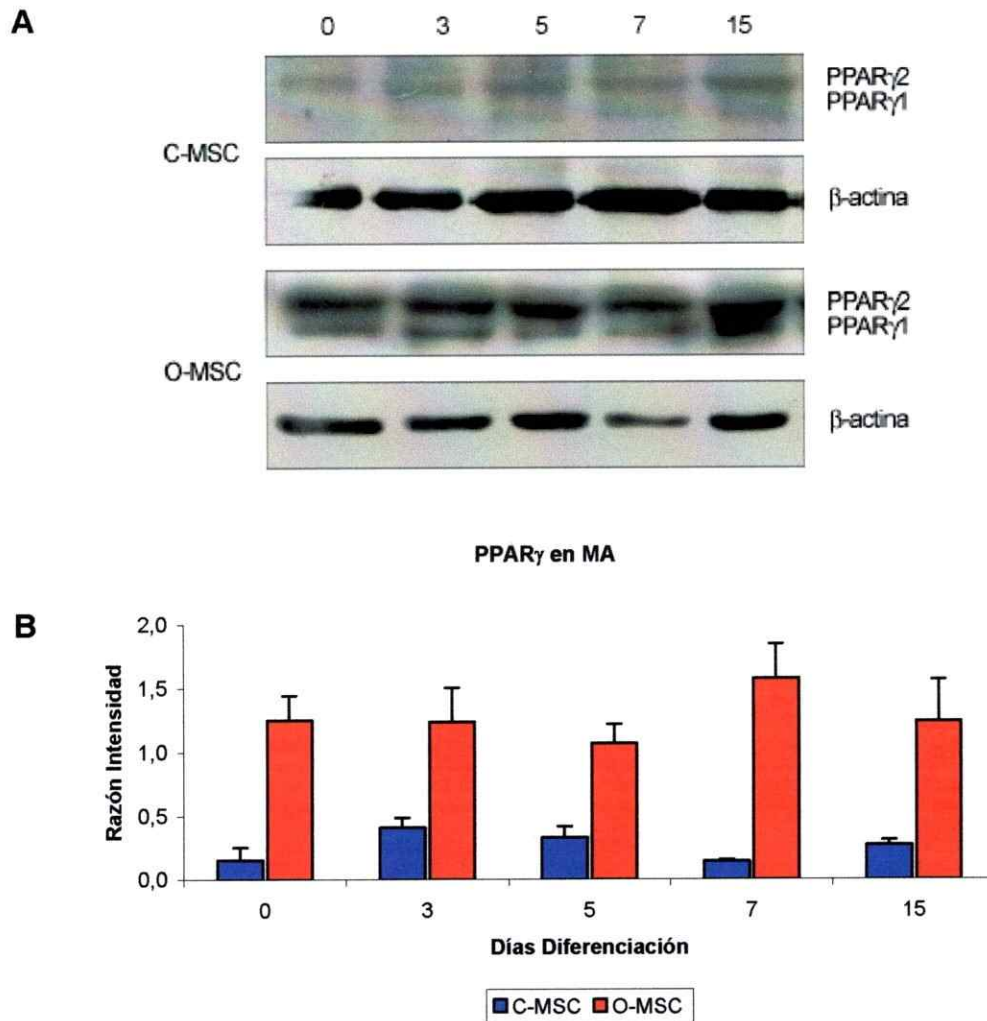
Se analizó la expresión y localización del factor de transcripción adipogénico PPAR $\gamma$  en MSCs mediante inmunofluorescencia (figura 14). En las C-MSCs, se observan bajos niveles de expresión de PPAR $\gamma$ , tanto en la condición basal (medio basal) como en condiciones de diferenciación adipogénica. Sin embargo, al analizar la expresión de PPAR $\gamma$  en las O-MSCs, se observa un alto nivel de expresión en todas las condiciones estudiadas. Cabe señalar que, en todas las condiciones estudiadas, la localización de PPAR $\gamma$  fue nuclear.

#### **3.2. Análisis de la expresión de PPAR $\gamma$ mediante Western Blot**

Se estudió la abundancia relativa de PPAR $\gamma$  midiendo los niveles de proteína mediante Western Blot a diferentes tiempos de diferenciación adipogénica (3, 5, 7 y 15 días de diferenciación). En primer lugar, al comparar la abundancia relativa de PPAR $\gamma$  entre las C-MSCs y O-MSCs en condiciones basales (MSCs cultivadas en medio DMEM-SF), se observa que existe una mayor expresión de este factor de transcripción en las O-MSCs respecto a las C-MSCs (figura 15, A). Así, la expresión de PPAR $\gamma$  en las C-MSCs equivale a un 12,6% de la expresión observada en las O-MSCs. Esta diferencia es estadísticamente significativa ( $p < 0,005$ ; ANDEVA) y se mantiene en todos los tiempos evaluados.



**Figura 14. Inmunofluorescencia de PPAR $\gamma$  en MSCs.** Visualización de la localización de PPAR $\gamma$  mediante inmunofluorescencia en células troncales mesenquimáticas normales (C-MSC) y osteoporóticas (O-MSC). MA, medio adipogénico; *control ab*, control sin anticuerpo primario; *Basal*, MSCs cultivadas en medio DMEM-SF sin MA. Barra = 10  $\mu$ m.



**Figura 15. Análisis de la expresión de PPAR $\gamma$  en MSCs mediante Western Blot.** (A) Western Blot representativo de una muestra control (C-MSC, n=3) y de una muestra osteoporótica (O-MSC, n=3). Las bandas correspondientes a las isoformas PPAR $\gamma$ 2 y PPAR $\gamma$ 1 fueron normalizadas por la intensidad de  $\beta$ -actina. (B) Abundancia relativa de PPAR $\gamma$  en C-MSC (barras azules) y O-MSC (barras rojas), en medio adipogénico (MA). La diferencia entre C-MSC y O-MSC es estadísticamente significativa ( $p < 0,005$ , ANDEVA). Los datos son expresados como promedio  $\pm$  error estándar.

Al analizar el comportamiento de cada tipo de muestra por separado, se observa que en las C-MSCs existe un bajo nivel de PPAR $\gamma$  en condiciones basales (figura 15, B). Durante la diferenciación adipogénica, el nivel de expresión de esta proteína aumenta a los 3 días (aproximadamente 2,5 veces), para luego disminuir

paulatinamente hasta el día 15 de diferenciación. En las O-MSCs se observa que la abundancia de PPAR $\gamma$  se mantiene en niveles altos y constantes respecto a las C-MSCs, permaneciendo en este nivel de abundancia hasta el día 15 de diferenciación.

## VI. DISCUSION

La osteoporosis se ha convertido en un tema central de salud pública, debido al alto costo de la enfermedad y al incremento de su prevalencia en los últimos años, producto del aumento en la esperanza de vida. Si bien el metabolismo óseo ha sido estudiado extensivamente en el último tiempo, aún no existe claridad sobre los mecanismos que permiten el desarrollo de la osteoporosis. Como consecuencia, no se ha desarrollado un tratamiento preventivo, existiendo solamente fármacos paliativos, es decir, que evitan la resorción ósea, pero que no logran revertir el proceso de formación de tejido adiposo en la médula ósea.

Considerando estos factores, se hace de gran interés estudiar los procesos involucrados en la formación de los tejidos óseo y adiposo, a partir de las células troncales mesenquimáticas existentes en la médula ósea, así como estudiar el efecto que ciertos factores externos, como hormonas y proteínas morfogenéticas del hueso, ejercen sobre la diferenciación adipogénica y osteogénica.

Acorde a lo expuesto anteriormente, el objetivo de este trabajo de tesis fue estudiar el perfil de expresión de dos factores de transcripción específicos, Runx2 y PPAR $\gamma$  y observar si existen diferencias entre MSCs obtenidas de donantes sanas y de donantes osteoporóticas. El caso de Runx2 ha sido estudiado, principalmente, en el marco del metabolismo óseo, mientras que PPAR $\gamma$  ha sido estudiado extensivamente respecto a su rol en el metabolismo de los ácidos grasos.

En este trabajo hemos enfocado nuestro estudio sobre la manera en que estos dos factores de transcripción se comportan específicamente durante la diferenciación de MSCs hacia osteoblastos (Runx2) y adipocitos (PPAR $\gamma$ ), con énfasis sobre la

diferenciación osteogénica. Los resultados obtenidos muestran que en estas células no existen diferencias en el nivel de expresión de Runx2, como se revela mediante Western Blot e Inmunofluorescencia, por lo que la disminución en la diferenciación osteogénica observada en las MSCs de donantes osteoporóticas no se explicaría por una disminución en la abundancia de este factor transcripción. Nuestros resultados sugieren, además, que las diferencias observadas entre MSCs de donantes sanas y osteoporóticas, respecto a la preferencia de estas últimas por la diferenciación hacia el linaje adipogénico (Rodríguez y col., 1999; Rodríguez y col., 2000; Rodríguez y col., 2004), podría explicarse por una elevada expresión de PPAR $\gamma$ .

No obstante, es de interés analizar estos resultados en profundidad, puesto que son de gran importancia para comprender la manera en que los fenómenos observados en este trabajo pueden incidir en el establecimiento de esta enfermedad.

### **1. Runx2, BMP-2 y Osteogénesis**

La importancia de Runx2 en la osteogénesis está documentada en líneas celulares con capacidad de diferenciación hacia el linaje osteogénico, mediante la introducción del gen en estas células, aunque algunos reportes sobre la expresión de Runx2 durante la osteogénesis son contradictorios (para una revisión, refiérase a Franceschi y Xiao, 2003). Por ejemplo, Gori y col. (1999) describen un máximo de abundancia de *runx2* a las 4 horas de diferenciación, en la línea celular humana estromal hMS, mediante la técnica de RT-PCR; sin embargo, en este estudio, el tiempo máximo estudiado fue de 24 horas. En esta misma línea celular, se ha observado un valor máximo en la abundancia relativa de *runx2* a partir de las 12 horas de diferenciación, manteniéndose en un nivel máximo tras 3 días (Thomas y col., 1999). Otro trabajo, utilizando diversas líneas celulares derivadas de fragmentos de hueso

cortical humano, muestra niveles constitutivos de *runx2* en todos los tiempos evaluados, desde 4 a 36 días de diferenciación, mediante análisis de Northern Blot (Prince y col., 2001). Esta última observación coincide con otro reporte en la línea celular humana hMS, en que no se observan cambios en la abundancia del transcrito de *runx2* entre 3 y 14 días de diferenciación osteogénica, pese a que se observa un aumento en los niveles de osteocalcina y de fosfatasa alcalina (Shui y col., 2003). Por lo tanto, se puede deducir que no existe un modelo claro sobre el perfil de expresión de Runx2, durante la osteogénesis, tanto a nivel transcripcional como traduccional, y los resultados observados en estos trabajos pueden diferir dependiendo de las condiciones experimentales empleadas.

Durante el desarrollo de esta memoria, la optimización del protocolo de amplificación de *runx2* mediante RT-PCR requirió del estudio y prueba de distintas condiciones de amplificación y de parejas de partidores. No obstante, se logró la amplificación de *runx2* en las muestras estudiadas, observándose bajos niveles de transcrito en las O-MSCs, sólo a tiempos largos de diferenciación. Este resultado difiere, en parte, de los reportes en líneas celulares, que sugieren que Runx2 es necesario para la diferenciación osteogénica. Se ha observado que la elevada expresión de Runx2 puede conducir a anomalías esqueléticas *in vivo* (Liu y col., 2001; Geoffroy y col., 2002), lo que sugiere que bajos niveles de transcrito para *runx2* son suficientes para permitir, al menos en parte, la diferenciación hacia el linaje osteogénico de MSCs. Es posible, entonces, que la técnica de RT-PCR no presente la sensibilidad necesaria para medir bajos niveles de transcrito, como es el caso de Runx2. No obstante, para determinar si, efectivamente, existen niveles extremadamente bajos de transcrito para Runx2 en las O-MSCs, en nuestro laboratorio se encuentra en etapa de puesta en marcha el análisis de expresión génica para *runx2*

y otros marcadores osteogénicos (*colágeno I*, *osteocalcina*) y factores de transcripción (*osterix*, *msx2*), mediante PCR Cuantitativo en Tiempo Real (q-PCR).

Una baja expresión de *runx2* se puede explicar de varias maneras. En primer lugar, *runx2* puede aumentar en algún período que no estamos evaluando en esta tesis, ya sea en tiempos más tempranos (a pocas horas de iniciado el estímulo de diferenciación) o en tiempos más tardíos (después de 14 o 21 días). En segundo lugar, existe la posibilidad de que Runx2 sea regulado a nivel traduccional. En esta tesis, observamos modestos aumentos del nivel de la proteína entre las 3 y 24 horas de iniciada la diferenciación. En este período de tiempo, el transcrito del gen *runx2* puede ser rápidamente procesado y posteriormente degradado, existiendo niveles del mensajero indetectables mediante RT-PCR convencional y posterior visualización en geles de agarosa.

Existen algunos reportes que sugieren que Runx2 podría, en efecto, disminuir durante la diferenciación osteogénica (para una revisión, refiérase a Stock y Otto, 2005). Se ha reportado que *runx2* no varía su expresión, a nivel de ARNm, en pre-osteoblastos inmortalizados, aunque se observan cambios a nivel de proteína durante la diferenciación osteogénica (Prince y col., 2001). En apoyo a esta observación, se ha demostrado que *runx2* puede tener autorregulación negativa en el promotor P1, que dirige la expresión de la isoforma Runx2-II (Drissi y col., 2000).

Recientemente, se ha postulado que Runx2 es necesario sólo para el compromiso de las MSCs hacia la vía osteogénica, siendo a su vez necesaria la inhibición de su expresión durante la diferenciación terminal, en donde posiblemente otros factores de transcripción son necesarios (Komori, 2006). De hecho, la sobreexpresión de Runx2 en ratones conduce a osteopenia *in vivo*, como se señaló



previamente, sugiriendo que la expresión de Runx2 en osteoblastos adultos puede ser perjudicial para el metabolismo óseo (Liu y col., 2001; Geoffroy y col., 2002).

Nuestros resultados sobre el perfil de expresión de *runx2* coinciden con los reportes de Prince (2001) y Shui (2003), ya que hemos observado que en las C-MSCs no existe un cambio importante en la abundancia relativa del transcrito del gen *runx2*, o en los niveles de proteína de Runx2. Sin embargo, cabe señalar que existen dos diferencias importantes entre estos reportes y nuestro trabajo: el tipo de células y la ventana temporal analizada. El trabajo con líneas celulares puede presentar diferencias respecto al uso de cultivos primarios; en efecto, nosotros observamos en la línea celular pre-osteoblástica SaOS, que existe un perfil de expresión de *runx2* que difiere del observado en las muestras de MSCs de donantes postmenopáusicas sanas, lo que confirma que la comparación entre MSCs y líneas celulares debe ser realizada teniendo en cuenta estas diferencias.

Se ha reportado, en términos generales, que Runx2 es un factor de transcripción que funciona como un "integrador" dentro de la célula, para facilitar la diferenciación. Este rol integrador se desarrolla mediante la interacción con otras proteínas, especialmente con otros factores de transcripción. Nuestros resultados sugieren que, si efectivamente BMP-2 tiene un efecto pro-osteogénico *in vivo*, éste no estaría mediado por una inducción directa de la proteína Runx2. No se observó un aumento estadísticamente significativo en la expresión de este factor de transcripción producto de la adición de BMP-2 al medio de cultivo, tanto a nivel del ARNm como de la proteína (como se evaluó mediante western blot e inmunofluorescencia), resultado que apoya observaciones previas de nuestro grupo de trabajo, en que la adición de BMP-2 no induce un aumento significativo en el depósito de calcio (datos no publicados).

Sin embargo, nuestros resultados se contradicen con un reporte que, utilizando células osteoblásticas obtenidas desde el fémur de pacientes sometidas a artroplastía, observó un aumento en la abundancia relativa de *runx2* tras 20 días de incubación con BMP-2 (Nöth y col., 2003), y con otro estudio en que se observa una inducción de *runx2* tras 1 hora de incubación, en la línea celular preosteoblástica inmortalizada hMS (Gori y col., 1999). También se ha descrito un aumento de *runx2* inducido por BMP-2 en la línea celular C2C12 (Lee y col., 2002; Lee y col., 2003), aunque los tiempos analizados y las condiciones experimentales difieren de las utilizadas en nuestro trabajo.

No obstante lo anteriormente expuesto, el leve aumento observado en los niveles de la proteína Runx2 en las MSCs en este trabajo puede ser suficiente para ejercer un efecto pro-osteogénico en el contexto de la médula ósea. Adicionalmente, es importante enfatizar que estos experimentos no son realizados en líneas celulares, sino en muestras humanas de pacientes diferentes, lo que implica un background genético distinto. Además, se observó el mismo perfil de expresión de Runx2 (ya sea a nivel de proteína como de ARN), en las muestras analizadas.

Respecto al rol de la fosforilación de Runx2, los antecedentes previos disponibles en la literatura son contradictorios. Se ha descrito una disminución de la actividad de Runx2 cuando dos residuos conservados de serina en las posiciones 104 y 451 se encuentran fosforilados (Wee y col., 2002), aunque la existencia de un dominio denominado PST, rico en serinas y treoninas, es esencial para la actividad de Runx2 en la línea celular preosteoblástica MC3T3-E1 (Xiao y col., 2000). En otro estudio, se analizó el grado de fosforilación de tirosina, treonina y serina, encontrándose un modesto aumento en la fosforilación de treonina entre los 3 y 7 días (Shui y col., 2003), por lo que decidimos evaluar el grado de fosforilación de este

residuo y, efectivamente, en un experimento realizado con una muestra normal y otra osteoporótica, se observó un aumento en el grado de fosforilación similar en ambos tipos de muestras, a las 12 horas de diferenciación, coincidiendo con el leve aumento en la abundancia de Runx2 evidenciado mediante Western Blot. Actualmente, estamos aumentando el número de muestras a analizar, para profundizar sobre el nivel y la cinética de fosforilación de Runx2, para determinar si, efectivamente, existen diferencias entre C-MSCs y O-MSCs.

Nuestro grupo de trabajo ha analizado cuantitativamente diversos marcadores de diferenciación osteogénica en MSCs postmenopáusicas (Rodríguez y col, 2000). En este trabajo, decidimos analizar la expresión del gen codificante para fosfatasa alcalina (*alp*) como marcador de diferenciación, mediante RT-PCR. Se observaron diferencias importantes entre C-MSCs y O-MSCs. Las C-MSCs presentan una mayor abundancia relativa del transcrito de *alp*, respecto a las O-MSCs, en las cuales se observa el transcrito sólo a los 3 días de diferenciación. Este resultado se correlaciona con un reporte de nuestro laboratorio (Rodríguez y col., 2000), en que se observó también que, mientras que las C-MSCs presentaban un claro aumento en la actividad de ALP, ésta se mantiene en un nivel basal en las O-MSCs.

En conjunto, los resultados relativos a Runx2 y la osteogénesis, sugieren fuertemente que existen distintos niveles de regulación en las MSCs, y que sólo algunos de ellos se encuentran alterados en las células de donantes osteoporóticas. Mientras que la localización, fosforilación y los niveles de proteína de Runx2 son similares en C-MSCs y O-MSCs, existe una mayor abundancia del transcrito de *runx2* y *alp* en las MSCs de donantes sanas.

Además de las diferencias observadas a nivel de la expresión de *runx2*, es probable que en las MSCs de donantes osteoporóticas existan alteraciones a nivel de

la actividad de este factor de transcripción que puedan contribuir, en mayor o menor medida, a la menor diferenciación osteogénica de estas células. Cabe señalar que, durante el desarrollo de esta tesis, se realizó una serie de experimentos para la transfección de estas células con un plásmido diseñado para permitir el estudio de la actividad de Runx2. Sin embargo, no se obtuvo el resultado esperado (no se logró una transfección positiva, mediante diversas técnicas, las cuales fueron probadas mediante la transfección positiva de una línea celular), por lo que un experimento pendiente es el análisis de la capacidad de unión de Runx2 a sus secuencias de unión en el ADN (denominadas OSE, de "osteoblast specific element") presentes en diversos genes involucrados en la osteogénesis.

La menor diferenciación de las MSCs de donantes osteoporóticas podría explicarse por un segundo mecanismo: una alteración en la vía de transducción de señales que impida traducir la expresión de Runx2 en un aumento de la diferenciación osteogénica. En apoyo a esta hipótesis, experimentos realizados por nuestro laboratorio muestran que ciertas vías de transducción de señales se encuentran "activadas" en las MSCs de donantes osteoporóticas, como las ERK1/2, que se encuentran más fosforiladas a nivel basal en las O-MSCs (Rodríguez y col., 2004). En este mismo sentido, durante el desarrollo de esta tesis se midió el grado de fosforilación de Smad1 que, como se indicó en la introducción, es la principal proteína señalizadora de BMP-2, observándose nuevamente que se encuentra un mayor nivel de Smad1 fosforilado en las O-MSCs a nivel basal (datos no mostrados). Estas observaciones sugieren que existen otras vías que se encuentran alteradas en las O-MSCs, que pueden ser a su vez una interesante fuente de posibles estudios a futuro.

Un tercer mecanismo que podría explicar la menor diferenciación osteogénica observada en las MSCs de donantes osteoporóticas es la presencia de alteraciones a

nivel de la maduración de estas células durante la diferenciación. Esta hipótesis se ve respaldada por los bajos niveles de *alp*, que es un marcador tardío de diferenciación, y por la menor actividad de fosfatasa alcalina y el menor depósito de calcio de las O-MSCs que ha sido reportado previamente (Rodríguez y col., 2000). Sin embargo, no existe suficiente evidencia que permita establecer qué fenómenos estarían ocurriendo de manera diferencial o alterada en las MSCs de donantes osteoporóticas durante su maduración hacia el linaje osteogénico, aunque es probable que las diferencias observadas a nivel transcripcional entre C-MSCs y O-MSCs jueguen un rol importante en la menor diferenciación de las células de donantes osteoporóticas.

En términos generales, en este trabajo se observó diferencias entre C-MSCs y O-MSCs a nivel transcripcional, observándose en estas últimas una baja abundancia del transcrito para los genes *runx2* y *alp*. Se descartó que los ADNc de las O-MSCs estuvieran mal sintetizados o en mal estado mediante la utilización de un ARN mensajero exógeno (*dap*) durante la síntesis del ADNc. También se midió la abundancia relativa del gen *plzf*, que ha sido recientemente implicado en la osteogénesis, aunque de manera preliminar. Se observó niveles similares del transcrito en muestras de C-MSCs y O-MSCs, en los mismos tiempos analizados en esta tesis (datos no mostrados), lo que descartó un error debido al estado de los ADNc de donantes osteoporóticas (problemas de síntesis, contaminación y/o degradación del ADNc). Por último, se realizó la determinación de la abundancia del transcrito para los genes *runx2* y *alp* en muestras de tres donantes osteoporóticas distintas. Estos resultados demuestran que las diferencias observadas a nivel de PCR entre C-MSCs y O-MSCs son reales y que no representan errores en el desarrollo de los experimentos.

Un desafío evidente que se desprende de nuestros resultados es la búsqueda de nuevos factores que puedan regular Runx2. Una opción es el estudio del efecto que

leptina, hormona que se encuentra en altos niveles en personas con sobrepeso y que ha sido propuesta como una proteína pro-osteogénica (debido a la disminución en la incidencia de osteoporosis que ha sido observada en mujeres con sobrepeso), pueda tener sobre Runx2. Nuestro grupo de trabajo ha reportado la expresión de los receptores de leptina en las MSCs de ambos tipos de donantes (Hess y col., 2004), y resultados preliminares obtenidos durante el desarrollo de esta tesis indican que leptina puede aumentar los niveles de Runx2 en las C-MSCs, medidos mediante Western Blot, mientras que puede disminuirlos en las O-MSCs, en los tiempos analizados. Sin embargo, estos datos no fueron incluidos en esta tesis debido al bajo número de muestras analizadas. Esta observación puede correlacionarse con un reporte reciente que demuestra que la adición de 1,5  $\mu\text{g/ml}$  de leptina a MSCs obtenidas de médula ósea, puede inducir un aumento en la expresión de *runx2* tras 3 semanas de estímulo (Chang y col., 2006). Sin embargo, este estudio presenta dos características que impiden compararlo con nuestro estudio: a) el largo tiempo de estimulación (21 días) y las pacientes seleccionadas (un hombre de 19 años y una mujer de 37).

Una interesante proyección de la tesis es el análisis exhaustivo del grado de fosforilación de Runx2, en sus distintos residuos, junto con el análisis de expresión génica mediante PCR Cuantitativo, y el estudio del efecto de BMP-2 sobre el grado de fosforilación (experimento que no fue posible realizar en esta tesis debido a, por una parte, el alto número de células que requería y, además, por el alto costo del BMP-2).

Además, una segunda proyección que se desprende de estos resultados es el estudio de diferentes vías de transducción de señales, durante la diferenciación osteogénica de MSCs. En este sentido, existe evidencia que sugiere que las vías de JNK y p38 pueden estar implicadas en la transducción del efecto pro-osteogénico de BMP-2 en las líneas celulares murinas pre-osteoblásticas MC3T3-E1 (Guicheux y col.,

2003; Lemonnier y col., 2004) y C2C12 (Lee y col., 2002), y en cultivos primarios de osteoblastos humanos purificadas a partir de hueso trabecular (Lai y col., 2002).

## 2. PPAR $\gamma$ y Adipogénesis

Como se ha señalado en la introducción, la disminución en el número de osteoblastos observado en la médula ósea de mujeres osteoporóticas ha sido relacionada con un aumento en el número de adipocitos. Por lo tanto, puede esperarse que en las MSCs de donantes osteoporóticas, además de observarse una menor expresión de Runx2, ocurra un aumento en la abundancia del factor de transcripción adipogénico PPAR $\gamma$ .

Si bien sólo observamos una disminución en la abundancia relativa de *runx2* a nivel de ARNm, los resultados observados para PPAR $\gamma$  se aproximaron en mayor medida a lo esperado. En primer lugar, se puede observar en los experimentos de inmunofluorescencia que existen diferencias entre C-MSCs y O-MSCs, a los 7 días de diferenciación, y donde los núcleos que presentan marca positiva para PPAR $\gamma$  en las O-MSCs se localizan en células que presentan depósitos de grasa, lo que no se observa de la misma manera en las C-MSCs.

Además, el análisis mediante Western Blot muestra que PPAR $\gamma$  está expresándose en condiciones basales en ambos tipos de muestras, pero en niveles más altos en las MSCs de donantes osteoporóticas, lo que puede explicar la mayor diferenciación de O-MSCs hacia el linaje adipogénico. Una vez comenzada la diferenciación, el nivel de PPAR $\gamma$  aumenta entre los 3 y 7 días de diferenciación en las C-MSCs. Este perfil de abundancia de PPAR $\gamma$  difiere del observado en MSCs de donantes osteoporóticas, en las cuales se observa que, durante el curso de la

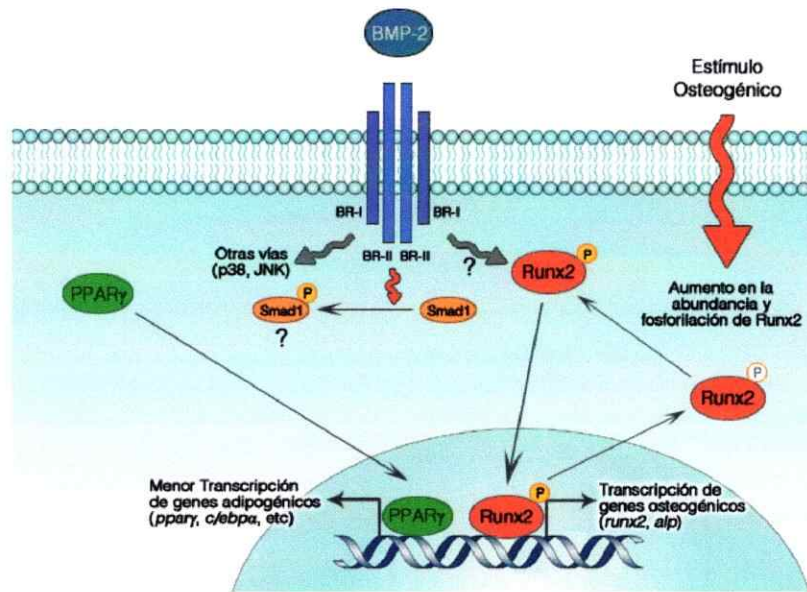
diferenciación, los niveles de PPAR $\gamma$  permanecen elevados, lo que sugiere que el aumento de la abundancia de este factor transcripción es un fenómeno que ocurre de manera constitutiva en donantes osteoporóticas.

En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la diferencia entre mujeres sanas y osteoporóticas, más que en la capacidad de diferenciarse hacia el tejido óseo, está en la anormal preferencia por la vía adipogénica en mujeres osteoporóticas, la que puede explicarse por los altos niveles de PPAR $\gamma$  medidos en las O-MSCs durante la diferenciación adipogénica, lo que nos permite sugerir un modelo de regulación de la diferenciación de las MSCs hacia una u otra vía (figura 16). Otro mecanismo que podría influir en el establecimiento de una preferencia por la vía adipogénica en las O-MSCs es una represión de Runx2 mediada por PPAR $\gamma$  ya que, como señalamos previamente, este fenómeno ha sido descrito por otros autores (Lecka-Czemik y col., 1999; Jeon y col., 2003, Khan y Abu-Amer, 2003; Akune y col., 2004).

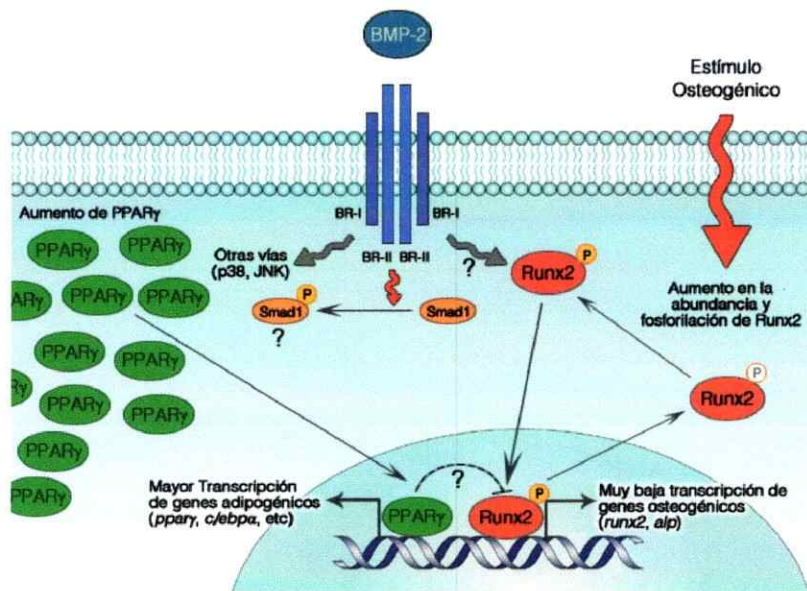
Existen pocos reportes en la literatura sobre el perfil de expresión de PPAR $\gamma$  durante la adipogénesis de MSCs humanas. La mayoría de los estudios se centra en medir PPAR $\gamma$  a tiempos largos de diferenciación, los que superan a veces los 15 días. Un estudio reciente que utiliza muestras de MSCs de donantes adultos, muestra el perfil de expresión del transcrito para el gen *ppary*, observándose sólo a partir del día 7, mediante RT-PCR (Sekiya y col., 2004). Además, en este estudio se cuantifica la abundancia relativa de otros genes relacionados con la adipogénesis (*c/ebp $\alpha$* , *lpl*, *fabp4*), observándose la expresión de éstos a partir del día 7, al igual que *ppary*.



MSC Normal



MSC Osteoporótica



**Figura 16. Regulación de Runx2 en MSCs.** En condiciones normales, el estímulo de diferenciación osteogénico induce un leve aumento en la abundancia y fosforilación de Runx2. La forma fosforilada de Runx2 puede translocar al núcleo e inducir la expresión de genes involucrados en la osteogénesis. A su vez, PPAR $\gamma$  se encuentra presente en baja abundancia en estas células, induciendo un nivel de expresión basal de genes relacionados con la adipogénesis (datos no mostrados). En MSCs de mujeres osteoporóticas, la elevada abundancia de PPAR $\gamma$  implica un aumento (no representado en este esquema) en la cantidad de este factor de transcripción presente en el núcleo, donde puede ejercer una represión en la actividad de Runx2, como ha sido reportado en líneas celulares, lo que puede implicar, a su vez, un aumento en la abundancia relativa de genes adipogénicos, incluyendo *ppary*.

En un trabajo más reciente, en que se analiza el perfil de expresión de PPAR $\gamma$  en un modelo murino de pérdida de masa ósea inducida por suspensión (proceso en que los animales son suspendidos de la cola, para simular las condiciones de gravedad cero que los astronautas encuentran en el espacio), se ha observado un aumento en la expresión de este factor de transcripción en MSCs sometidas a diferenciación adipogénica, tras 7 días de diferenciación, aunque no se analiza tiempos más cortos de diferenciación (Ahdjoudj y col., 2005).

Si bien en esta memoria no se presentan resultados de RT-PCR para *ppary*, los niveles de proteína observados no se correlacionan con el trabajo de Seyika y col. Una posible explicación es el origen de nuestras muestras, ya que se ha observado que la expresión de PPAR $\gamma$  aumenta con la edad (Misso y col., 2005), fenómeno que se encontraría asociado a un incremento en el tejido adiposo y a la aparición de alteraciones metabólicas, como la diabetes. Además, los resultados de los trabajos mencionados también difieren de lo observado en nuestro trabajo, en que se observa PPAR $\gamma$  desde la condición basal, con un leve aumento a partir del día 3 de diferenciación adipogénica. Adicionalmente, en estudios preliminares de nuestro grupo de trabajo, se ha determinado la abundancia relativa de otros genes involucrados en la adipogénesis, como *c/ebp $\alpha$* , *ap2* y *adipsina*, observándose un resultado similar al de *ppary* (datos no mostrados). Es interesante también señalar que se ha descrito, en ratones, que la expresión de PPAR $\gamma$  disminuye con la edad (Sung y col., 2004; Ye y col., 2005), al contrario de lo que se ha descrito en humanos, por lo que los reportes sobre PPAR $\gamma$  en estos animales pueden servir de modelo, pero no necesariamente corresponden a lo que puede ocurrir *in vitro* o *in vivo* en células humanas.

En conjunto, los resultados de esta tesis relativos a PPAR $\gamma$  muestran un nuevo panorama sobre el "comportamiento" de este factor de transcripción durante la adipogénesis, ya que, de acuerdo a nuestra búsqueda en la literatura, este es uno de los primeros trabajos donde se observa el perfil de expresión de PPAR $\gamma$  durante la diferenciación adipogénica temprana. Estos resultados sugieren, además, que una diferencia importante entre C-MSCs y O-MSCs se encuentra, principalmente, en la anormal abundancia de PPAR $\gamma$  en estas últimas células, y en su posible insensibilidad frente a factores externos. Una interesante proyección clínica de este trabajo es el estudio de las vías de transducción de señales que podrían estar alteradas en las MSCs de donantes osteoporóticas, con el fin de vislumbrar posibles rutas para el desarrollo de fármacos que puedan volver a estas células sensibles a factores pro-osteogénicos. También se hace de interés la exploración de mecanismos que permitan disminuir los elevados niveles PPAR $\gamma$  que se observan en las MSCs de estas donantes, en condiciones basales y durante la diferenciación adipogénica.

En este sentido, una proyección importante es el análisis del grado de fosforilación de PPAR $\gamma$ , puesto que, como se señaló en la introducción, se ha descrito que la fosforilación de este factor de transcripción en determinados residuos puede regular negativamente su actividad.

Pese a que nuestros resultados presentados en este trabajo no nos permiten dilucidar si existe una relación entre PPAR $\gamma$  y Runx2, al menos existe una observación experimental que puede sugerir una posible interacción. Durante la diferenciación adipogénica de las MSCs, se midió la abundancia relativa de *runx2* mediante RT-PCR. Se observó niveles bajos del transcrito durante la adipogénesis de C-MSCs; sin embargo, no se observó el transcrito durante la adipogénesis de O-MSCs (datos no

mostrados). Como se señaló en la introducción de este trabajo, se ha reportado que PPAR $\gamma$  puede inhibir la expresión de Runx2 en las líneas celulares murinas preosteoblásticas MC3T3-E1 y ROS17/2.8 (Jeon y col., 2003) e, inversamente, se ha demostrado que la insuficiencia de PPAR $\gamma$  en ratones *ppary*<sup>-/-</sup> induce un aumento en la masa ósea (Akune y col., 2004). Por lo tanto, es interesante notar que nuestros datos preliminares sugieren que, en células en que existen altos niveles de PPAR $\gamma$ , como las O-MSCs, no es posible apreciar *runx2* a nivel de ARNm. Inversamente, es interesante señalar que el transcrito de PPAR $\gamma$  no se observa durante la osteogénesis (datos no mostrados), en C-MSCs y O-MSCs, lo que puede sugerir que la inhibición o disminución de la expresión de PPAR $\gamma$  es necesaria para que pueda existir osteogénesis y que, por el contrario, puede existir expresión de Runx2 durante la adipogénesis, pero PPAR $\gamma$  puede estar inhibiendo su actividad, lo que se correlaciona con los estudios mencionados.

En resumen, en este trabajo se ha observado una serie de fenómenos que ocurren de manera diferencial en C-MSCs y O-MSCs. Los resultados obtenidos muestran que, en mujeres osteoporóticas, existe una alteración en la vía de diferenciación adipogénica, reflejada en los altos niveles de PPAR $\gamma$  observados en células cultivadas *in vitro*, lo que sugiere interesantes proyecciones de este trabajo, especialmente el estudio en profundidad de los mecanismos por los cuales estas células presentan una alteración en esta vía.

## VII. CONCLUSIONES

1. El aumento en la capacidad de diferenciación adipogénica observada en las MSCs de donantes osteoporóticas se debe a un aumento en la abundancia de PPAR $\gamma$ , más que a una disminución en los niveles de Runx2.
2. El efecto pro-osteogénico que BMP-2 ejerce sobre la diferenciación osteogénica no se debe a una inducción de la expresión de Runx2 durante la diferenciación osteogénica temprana.
3. En conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que el aumento en la abundancia de PPAR $\gamma$  puede inducir un incremento en el potencial adipogénico de las MSCs de donantes osteoporóticas mediante un aumento en la abundancia de otras proteínas pro-adipogénicas y/o mediante una inhibición de la actividad de Runx2, lo que puede influir directamente en el establecimiento de la osteoporosis.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

Abdallah B.M., Haack-Sørensen M., Fink T. y Kassem M. 2006. Inhibition of osteoblast differentiation but not adipocyte differentiation of mesenchymal stem cells by sera obtained from aged females. *Bone*. 39:181-188.

Adams M., Reginato M., Shao D., Lazar M.A. y Chatterjee V.K. 1997. Transcriptional Activation by Peroxisome Proliferator-activated receptor  $\gamma$  is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated Protein Kinase Site. *J. Biol. Chem.* 272:5128-5132.

Afzal F., Pratap J., Ito K., Ito Y., Stein J., van Wijnen A.J., Stein G.S., Lian J.B. y Javed A. 2005. Smad function and intranuclear targeting share a Runx2 motif required for osteogenic lineage induction and BMP2 responsive transcription. *J. Cell. Physiol.* 204:63-72.

Ahdjoudj S., Kaabeche K., Holy X., Fromigue O., Modrowski D., Zerath E. y Marie P. J. 2005. Transforming growth factor-beta inhibits CCAAT/enhancer-binding protein expression and PPAR $\gamma$  activity in unloaded bone marrow stromal cells. *Exp. Cell Res.* 303:138-147.

American College of Obstetricians and Gynecologists. 2004. Osteoporosis. *Obstet. Gynecol.* 104: 66S-76S.

Akune T., Ohba S., Kamekura S., Yamaguchi M., Chung U., Kubota N., Terauchi Y., Harada Y., Azuma Y., Nakamura K., Kadowaki T. y Kawaguchi H. 2004. PPAR $\gamma$  insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *J. Clin. Invest.* 113:846-855.

Arinovich R., Arraigada M., Amaral H., Milinarsky A., Oviedo S., Marin P., Grant C., Fischer S. y Arinovich M. Investigación de Osteoporosis en Chile. FUNDOP, XIV Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Osteología y Metabolismo Mineral, SCHOMM, 21-23 de Abril 2006.

Aubin J., Davy A. y Soriano P. 2004. In vivo convergence of BMP and MAPK signaling pathways: impact of differential Smad1 phosphorylation on development and homeostasis. *Genes Dev.* 18:1482-1494.

Banerjee C., Javed A., Choi J., Green J., Rosen V., van Wijnen A.J., Stein J.L., Lian J.B. y Stein G.S. 2001. Differential regulation of the two principal Runx2/Cbfa1 N-terminal isoforms in response to Bone Morphogenetic Protein-2 during development of the osteoblast phenotype. *Endocrinology.* 142:4026-4039.

Borah B., Ritman E.L., Dufresne T.E., Jorgensen S.M., Liu S., Sacha J., Phipps R.J. y Turner R.T. 2005. The effect of risedronate on bone mineralization as measured by micro-computed tomography with synchrotron radiation: correlation to histomorphometric indices of turnover. *Bone.* 37:1-9.

Barak Y., Nelson M.C., Ong E.S., Jones Y.Z., Ruiz-Lozano P., Chien K.R., Koder A. y Evans R.M. 1999. PPAR $\gamma$  is required for placental, cardiac and adipose tissue development. *Mol. Cell.* 4:585-595.

Canalis E., Economides A. y Gazzerro E. 2003. Bone Morphogenetic Proteins, their antagonists, and the Skeleton. *Endocrine Reviews.* 24:218-235.

Chang Y., Shih D.T., Tseng C., Hsieh T., Lee D. y Hwang S. 2006. Disparate Mesenchyme-lineage tendencies in mesenchymal stem cells from human bone marrow and umbilical cell blood. *Stem Cells.* 24:679-685.

Chesnut III C.H., Skag A., Christiansen C., Recker R., Syakkestad J.A., Hoiseth A., Felsenberg D., Huss H., Gilbride J., Schimmer R.C. y Delmas P.D. 2004. Effects of oral ibandronate administered daily or intermittently on fracture risk in postmenopausal osteoporosis. *J. Bone Min. Res.* 19:1241-1249.

Compston J. 2002. Local biosynthesis of sex steroids in bone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87:5398-5400.

Diradourian C., Girard J. y Pégrier J. 2005. Phosphorylation of PPARs: from molecular characterization to physiological relevance. *Biochimie.* 87:33-38.

Drissi H., Luc Q., Shakoory R., Lopes S., Choi J., Terry A., Hu M., Jones S., Neil J.C., Lian J.B., Stein J.L., van Wijnen A.J. y Stein G.S. 2000. Transcriptional autoregulation of the bone related CBFA1/RUNX2 gene. *J. Cell. Physiol.* 184:341-350.

Ducy P., Zhang R., Geoffroy V., Ridall A.L. y Karsenty G. 1997. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell.* 89:747-754.

Ebeling P., Atley L., Guthrie J., Burger H., Dennerstein L., Hopper J. y Wark J. 1996. Bone Turnover Markers and Bone Density Across the Menopausal Transition. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81:3366-3371.

Epstein S. y Zaidi M. 2005. Biological properties and mechanism of action of ibandronate: application to the treatment of osteoporosis. *Bone.* 37:433-440.

Franceschi R.T. y Xiao G. 2003. Regulation of the Osteoblast-Specific Transcription factor, Runx2: responsiveness to Multiple Signal transduction pathways. *J. Cell. Biochem.* 88:446-454.

Geoffroy V., Kneissel M., Fournier B., Boyde A. y Matthias P. 2002. High bone resorption in adult aging transgenic mice overexpressing *cbfa1/runx2* in cells of the osteoblastic lineage. *Mol. Cell. Biol.* 22:6222-6233.

Gori F., Thomas T., Hicok K.C., Spelsberg T. y Riggs B.L. 1999. Differentiation of Human Marrow Stromal Precursor Cells: Morphogenetic Protein-2 increases *Osf2/Cbfa1*, enhances osteoblast commitment, and inhibits late Adipocyte Maturation. *J. Bone Miner. Res.* 14:1522-1535.

Guicheux J., Lemonnier J., Ghayor C., Suzuki A., Palmer G. y Caverzasio J. 2003. Activation of p38 Mitogen-activated Protein Kinase and c-Jun-NH2-Terminal Kinase by BMP-2 and their implication in the stimulation of Osteoblastic Cell Differentiation. *J. Bone Miner. Res.* 18:2060-2068.

Harada S. y Rodan G. 2003. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature.* 423:349-355.

Hassel B.S., Schmitt S., Hartung A., Roth M., Nohe A., Petersen N., Ehrlich M., Henis Y.I., Sebald W. y Knaus P. 2003. Initiation of Smad-dependent and Smad-independent Signaling via distinct BMP-receptor complexes. *J. Bone Joint Surg.* 85-A:44-51.

Hess R., Pino A.M., Ríos S., Fernández M. y Rodríguez J.P. 2004. High affinity leptin receptors are present in human mesenchymal stem cells (MSCs) derived from control and osteoporotic donors. *J. Cell. Biochem.* 94:50-57.

Hoodless P.A., Haerry T., Abdollah S., Stapleton M., O'Connor M.B., Attisano L. y Wrana J.L. 1996. MADR1, a MAD-related protein that functions in BMP2 signaling pathways. *Cell.* 85:489-500.

Horowitz, M. 1993. Cytokines and estrogen in bone: anti-osteoporotic effects. *Science,* 260:626-627.

Hu E., Kim J.B., Sarraf P. y Spiegelman B.M. 1996. Inhibition of adipogenesis through MAP Kinase-mediated phosphorylation of PPAR $\gamma$ . *Science.* 274:2100-2103.

Jeon M.J., Kim J.A., Kwon S.H., Kim S.W., Park K.S., Park S., Kim S.Y. y Shin C.S. 2003. Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor- $\gamma$  inhibits the Runx2-mediated transcription of osteocalcin in osteoblasts. *J. Biol. Chem.* 278:23270-23277.

Justesen J., Pedersen S.B., Stenderup K. y Kassem M. 2004. Subcutaneous adipocytes can differentiate into bone-forming cells in vitro and in vivo. *Tissue Eng.* 10:381-391.

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

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

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

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



- Lai C. y Cheng S. 2002. Signal Transductions induced by Bone Morphogenetic Protein-2 and Transforming Growth Factor- $\beta$  in normal human osteoblastic cells. *J. Biol. Chem.* 277:15514-15522.
- Lecka-Czernik B., Gubrij I., Moerman E.J., Kajkenova O., Lipschitz D.A., Manolagas S.C. y Jilka R.L. 1999. Inhibition of *Osf2/Cbfa1* Expression and Terminal Osteoblast Differentiation by *PPAR $\gamma$* . *J. Cell. Biochem.* 74:357-371.
- Lee K., Kim H., Li Q., Chi X., Ueta C., Komori T., Wozney J., Kim E., Choi J., Ryoo H. y Bae S. 2000. Runx2 is a common target of Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 and Bone Morphogenetic Protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces Osteoblast-Specific gene expression in the pluripotent Mesenchymal precursor cell line C2C12. *Mol. Cell. Biol.* 20:8783-8792.
- Lee K., Hong S. y Bae S. 2002. Both the Smad and p38 MAPK pathways play a crucial role in Runx2 expression following induction by transforming growth factor- $\beta$  and bone morphogenetic protein. *Oncogene.* 21:7156-7163.
- Lee M.H., Kim Y.J., Kim H.J., Park H.D., Kang A.R., Kyung H.M., Sung J.H., Wozney J.M., Kim H.J. y Ryoo H.M. 2003. BMP-2-induced Runx2 expression is mediated by *Dlx5*, and TGF- $\beta$  1 opposes the BMP-2-induced osteoblast differentiation by suppression of *Dlx5* expression. *J. Biol. Chem.* 278:34387-34394.
- Lee C., Olson P. y Evans R.M. 2003b. Minireview: Lipid Metabolism, Metabolic diseases, and Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Endocrinology.* 144:2201-2207.
- Lemonnier J., Ghayor C., Guicheux J. y Caverzasio J. 2004. Protein kinase C-independent activation of Protein Kinase D is involved in BMP-2-induced activation of stress mitogen-activated protein kinases JNK and p38 and osteoblastic cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 279: 259-264.
- Lian J.B., Stein J.L., Stein G.S., van Wijnen A.J., Montecino M., Javed A., Gutierrez S., Shen J., Zaidi S.K. y Drissi H. 2003. Runx2/Cbfa1 Functions: diverse regulation of gene transcription by chromatin remodeling and co-regulatory protein interactions. *Connec. Tissue Res.* 44:141-148.
- Lin J.T. y Lane J.M. 2004. Osteoporosis: a Review. *Clin. Orthop. Relat. R.* 425:126-134.
- Liu W., Toyosawa S., Furuichi T., Kanatani N., Yoshida C., Liu Y., Himeno M., Narai S., Yamaguchi A. y Komori T. 2001. Overexpression of *Cbfa1* in osteoblasts inhibits osteoblasts maturation and causes osteopenia with multiple fractures. *J. Cell. Biol.* 155:157-166.
- Lowell B.B. 1999. *PPAR $\gamma$* : an essential regulator of adipogenesis and modulator of fat cell function. *Cell.* 99:239-242.

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

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

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

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

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

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

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

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

Nöth U., Tuli R., Seghatoleslami R., Howard M., Shah A., Hall D.J., Hickok N.J. y Tuan R.S. 2003. Activation of p38 and Smads mediates BMP-2 effects on human trabecular bone-derived osteoblasts. *Exp. Cell. Res.* 291:201-211.

Nuttall M.E., Patton A.J., Olivera D.L., Nadeau D.P. y Gowen M. 1998. Human Trabecular bone cells are able to express both osteoblastic and adipocytic phenotype: implications for osteopenic disorders. *J. Bone Miner. Res.* 13:371-382.

Nuttall M.E. y Gimble J.M. 2000. Is there a therapeutic opportunity to either prevent or treat osteopenic disorders by inhibiting marrow adipogenesis? *Bone.* 27:177-184.

Otto F., Thornell A. P., Crompton T., Denzel A., Gilmour K., Rosewell I., Stamp G., Beddington R., Mundlos S., Olsen B., Selby P. y Owen M. J. 1997. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell.* 89:765-771.

Parhami F., Jackson S., Tintut Y., Le V., Balucan J., Territo M. y Demer L. 1999. Atherogenic diet and minimally oxidized low density lipoprotein inhibit osteogenic and promote adipogenic differentiation of marrow stromal cells. *J. Bone Miner. Res.* 14:2067-2078.

Pino A.M., Rodríguez J.M., Ríos S., Astudillo P., Leiva L., Seitz G., Fernández M. y Rodríguez J.P. 2006. Aromatase activity of human mesenchymal stem cells is stimulated by early differentiation, vitamin D and leptin. *J. Endocrinol.* 191:715-725.

Prince M., Banerjee C., Javed A., Green J., Lian J.B., Stein G.S., Bodine P. y Komm B.S. 2001. Expression and regulation of Runx2/Cbfa1 and osteoblast phenotypic markers during the growth and differentiation of human osteoblasts. *J. Cell. Biochem.* 80:424-440.

Raisz L. 2005. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J. Clin. Invest.* 115:3318-3325.

Rangwala S. y Lazar M.A. 2000. Transcriptional Control of Adipogenesis. *Annu. Rev. Nutr.* 20:535-559.

Reginster J.Y., Adami S., Lakatos P., Greenwald M., Stepan J.J., Silverman S.L., Christiansen C., Rowell L., Mairon N., Bonvoisin B., Drezner M.K., Emkey R., Felsenberg D., Cooper C., Delmas P.D. y Miller P.D. 2006. Efficacy and tolerability of once-monthly oral ibandronate in postmenopausal osteoporosis: 2 year results from the MOBILE study. *Ann. Rheum. Dis.* 65:654-661.

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

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

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

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

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

Saladin R., Fajas L., Dana S., Halvorsen Y., Auwerx J. y Briggs M. 1999. Differential regulation of Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\gamma$ 1 (PPAR $\gamma$ 1) and PPAR $\gamma$ 2

messenger RNA expresión in the early stages of adipogénesis. *Cell Growth Differ.* 10:43-48.

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

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

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

Stein G.S., Lian J.B., van Wijnen A.J., Stein J.L., Montecino M., Javed A., Zaidi S.K., Young D.W., Choi J. y Pockwinse S.M. 2004. Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. *Oncogene.* 23:4315-4329.

Stock M. y Otto F. 2005. Control of RUNX2 isoform expression: the role of promoters and enhancers. *J. Cell. Biochem.* 95:506-517.

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

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

Wee H., Huang G., Shigesada K. e Ito Y. 2002. Serine phosphorylation of RUNX2 with novel potential functions as negative regulatory mechanisms. *EMBO Reports.* 3:967-974.

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

Xiao G., Jiang D., Gopalakrishnan R. y Franceschi R.T. 2002. Fibroblast Growth Factor 2 induction of the osteocalcin gene requires MAPK activity and phosphorylation of the osteoblast transcription factor, Cbfa1/Runx2. *J. Biol. Chem.* 277:36181-36187.

Ye P., Zhang X.J., Wang Z.J. y Zhang C. 2006. Effect of aging on the expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the possible relation to insulin resistance. *Gerontology.* 52:69-75.

Zanchetta, J. 2006. XIV Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Osteología y Metabolismo Mineral, SCHOMM, 21-23 de Abril 2006.

Zhao Z., Zhao M., Xiao G. y Franceschi R.T. 2005. Gene transfer of the Runx2 transcription factor enhances osteogenic activity of bone marrow stromal cells in vitro and in vivo. *Mol. Ther.* 12:247-253.

Zheng H., Guo Z., Ma Q., Jia H. y Dang G. 2004. *Cbfa1/osf2* transduced bone marrow stromal cells facilitate bone formation in vitro and in vivo. *Calcif. Tissue Int.* 74:194-203.