ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Ana
Alonso Pérez

Tesis doctoral

Regulación y modulación de la osteoblastogénesis

Santiago de Compostela, 2022

Programa de doctorado en Medicina Molecular

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

TESIS DE DOCTORADO

REGULACIÓN Y MODULACIÓN DE LA OSTEOBLASTOGÉNESIS

Ana Alonso Pérez

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA MOLECULAR

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2022

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DEL AUTOR/A DE LA TESIS

D./Dña. **Ana Alonso Pérez**

Título da tese: **Regulación y modulación de la osteoblastogénesis**

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento y declaro que:

1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
2) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
3) Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.
4) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide la versión impresa con la presentada en formato electrónico.

Y me comprometo a presentar el Compromiso Documental de Supervisión en el caso que el original no esté depositado en la Escuela.

En **Santiago de Compsotela**, **18 de mayo de 2022**.

Firma electrónica

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR/TUTOR DE LA TESIS

D./Dña. **Rodolfo Gómez Vaamonde**

En condición de: **Tutor/a y director/a**

Título de la tesis: **Regulación y modulación de la osteoblastogénesis**

INFORMA:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D/Dña **Ana Alonso Pérez**, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne l os requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director/tutor de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

En **Santiago de Compostela**, **18 de mayo de 2022**

Firma electrónica

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES Y FINANCIACIÓN

La autora Ana Alonso Pérez declara no tener ningún conflicto de interés en la realización de esta tesis doctoral.

El trabajo de esta tesis doctoral ha recibido financiación del Instituto de Salud Carlos III confinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) (CP15/00007, PI16/01870, PI19/01446), la Fundación Mutua Madrileña (MMA2018-2), y la Fundación IDIS (Axudas predoutorais 2019).

Así consta en Santiago de Compostela, a 03 de junio de 2022.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DE APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA

La autora Ana Alonso Pérez declara poseer la autorización del Comité de ética de la investigación de Santiago-Lugo para el trabajo Estudio de los factores de transcripción asociados a los cambios en la metilación del ADN durante la osteoblastogénesis y su papel en la diferenciación del osteoblasto del promotor Dr. Rodolfo Gómez Vaamonde el 24 de mayo de 2016, con una modificación el 20 de abril de 2021.

Así consta en Santiago de Compostela, a 03 de junio de 2022.

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DE IMÁGENES Y FIGURAS

La autora Ana Alonso Pérez declara que todas las imágenes y figuras incluídas en la tesis doctoral "Regulación y modulación de la osteoblastogénesis" son de autoría propia.

Así consta en Santiago de Compostela, a 15 de junio de 2022.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AGRADECEMENTOS

No 2011 non tiña claro que carreira estudar, no 2016 non tiña claro que facer despois de acabala, pero no 2022 sei que todas as decisións que fun tomando sen telas moi claras foron as boas. Aínda así, non tomei ningunha sola, e sempre tiven xente moi boa cerca que me axudou a decidir e me acompañou en todas as decisións.

A primeira persoa a quen debo agradecer a existencia desta tese e o culpable de que tomase a decisión de embarcarme nela é a Ruddy. Sempre digo que non sei en que momento despois do bocadillo de xoubas lle pareceu boa idea acollerme no seu grupo, pero agradezo moito que así o decidise. Gracias por darme a oportunidade de dedicarme á investigación, pola túa sinceridade e implicación dende o inicio, e por loitar sempre polo modelo de grupo que queres e polo teu equipo. E gracias por todo o coñecemento non-científico impartido nestes anos.

O agradecemento máis grande debe ir para o meu grupo. A pesar de que din que este é un traballo complicado, o ben que o levo pasado no laboratorio fixo estes 6 anos moi fáciles. Eloi, gracias por recibirme cando cheguei ao laboratorio e por ser o *predoc* maior con máis tranquilidade do universo. *Mery G*, conseguimos disfrazarnos de osteoblasto e osteoclasto antes de que fose demasiado tarde, e agora só nos queda pendente titularnos no "Doctorado en parvadas." Temos todos os méritos acadados, só nos queda a folla do título. Moitas gracias por todo o apoio e axuda destes anos, un pracer compartir o noso metro de espazo contigo. Miriam *Antuán*, es a miña persoa favorita para meterme contigo e para ir comer ao sol como lagartos. Gracias por estar aí sempre que necesitei unha sesión de puños ou un reto de tiktoker. Andrés, antes de nada gracias pola axuda con R, es o meu programador preferido. Foi unha alegría que viñera alguén cun humor negro escuro para canalizar a maldade toda. Antía e María, a pesar de ser as últimas incorporacións parte deste traballo tamén é voso. Moitas gracias por toda axuda prestada. Gracias tamén a Alberto tanto pola axuda directa á tese como por implicarme na plataforma e na impresión 3D, un proxecto de futuro. E Vero, a ti teríache que escribir un parágrafo enteiro. Por axudarme e ensinarme tantísimo ao principio, e por vir

salvarme a vida ao final. Espero ter sorte que os nosos proxectos xuntas vaian saíndo para poder seguir aprendendo contigo.

Unha vez dadas as gracias a con quen máis horas compartín nos últimos anos, é importante darllas a quen ao longo de toda a vida me trouxo ata aquí. Cando no 2016 expuxen facer unha tese, sen financiación, e en tres anos (daquela parecía algo factible), na casa só recibín un "se é o que queres, adiante!". E ese adiante foi o que nos trouxo ata aquí hoxe. Iso, sumado ao *"que é (inserte aquí calquera problema) comparado coa inmensidade do universo?"* de meu pai, e o *"o non xa o tes"* de miña mai. Fixen do voso apoio os meus dogmas vitais e por iso este traballo e os sucesivos son nosos. Nosos e da Vacaloura máis xentil do lugar, a primeira irmá pequena Pepito Grillo coa irmá maior. Gracias por preocuparte sempre porque a miña relaxación cos prazos non me afectase ao traballo e por ser un exemplo de constancia e traballo duro.

Alguén dixo que sabías ben algo cando eras capaz de explicarllo a teus avós. Eu non sei si llelo expliquei ben ou non, pero Anita e Amigo sempre me atenden como si o que contase fose moito mellor que unha novela de vaqueros. Non poido máis que agradecer a felicidade de contarlle aos avós máis implicados na vida académica dos seus netos que xa poden estar tranquilos, que acabei, e que o celebraremos xuntos.

Temos falado mil veces de que a familia é algo que podemos escoller, e eu teño a sorte de ter familiares con relacións sanguíneas difíciles de explicar pero relacións emocionais que se explican solas. E esta familia sempre estivo aí para interesarse por min, para coidarme moito, e para darme as mellores sobremesas de todos os meus veráns, e estou moi agradecida polos tres.

Un gracias moi grande tamén aos meus amigos, Tpobenia, Fefé, grupo burbuja, ou como fósemos decidindo denominarnos segundo pasaban os anos. Por seguirme aceptando cando botei semanas sin cumplir por ter que quedarme en Santiago e por ter sempre o mellor plan para facer a vida máis divertida. Dende xornadas gastronómicas, a churrascadas ou festivais en caravana. Eu nunca me asustaría de vosoutros e sempre vos presentaría a todo o mundo que coñeza.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

E por último pero non menos importante, gracias a Ángel. Por verme sempre capaz de chegar ao final, e apoiarme para que iso sucedese. Por contaxiarte de todas as miñas alegrías e sacarme de todas as penas. Sempre dis

que isto é un traballo colectivo e ten por seguro que sen a túa axuda hoxe non sería posible.

Cando empecei a tese non tiña moi claro que era o que iba ser, implicar ou supoñer na miña vida. Unha vez pasado este trámite, podo concluir que tiven a enorme sorte de atopar neste proceso a miña vocación, de poder desfrutar do proceso, e sobre todo, da compañía durante este tempo. Moitísimas gracias!

En Foz, o 03 de xuño de 2022.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RESUMEN/ABSTRACT

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RESUMEN

Las patologías musculoesqueléticas son un denominador común en las sociedades actuales. Su incremento en los países desarrollados implica una gran carga social, sanitaria y económica. Las alteraciones óseas están presentes en múltiples patologías musculoesqueléticas, siendo frecuente una disminución de la calidad ósea y una reducción indirecta de la esperanza de vida

Los osteoblastos son las células a cargo de la formación de hueso. Estas células comparten un origen mesenquimal con los adipocitos. Esto significa que una formación óptima de hueso depende del correcto balance entre la diferenciación de células madre mesenquimales a osteoblasto y adipocito. No obstante, los protocolos actuales para diferenciar células madre mesenquimales humanas son caros y no reproducibles. La escasez y variabilidad intrínseca de este tipo celular dificulta el establecimiento de un método económico y fiable para estudiar el equilibrio osteoblasto-adipocito. La ruptura del balance osteoblastogénesis-adipogénesis es frecuente en múltiples enfermedades reumáticas. En este contexto, existen numerosas vías de señalización (WNT, BMPs) que trabajan en red para recibir la información y estímulos del ambiente de las células mesenquimales. Seguidamente, esta información se integra a través de factores de transcripción (FTx) que controlan los procesos osteoblastogénico y adipogénico. Su actividad está regulada epigenéticamente, siendo la metilación del ADN el mecanismo más común para ejercer estos efectos moduladores. Consecuentemente, los FTx adquieren un papel principal en la regulación de la osteoblastogénesis y la adipogénesis, convirtiéndose así en potenciales dianas terapéuticas o marcadores de enfermedad. Una de las enfermedades que se podría abordar a través de la modulación de los FTx es la osificación heterotópica (OH). Esta patología consiste en el crecimiento anormal del hueso en tejidos blandos, en un ambiente no-proosteoblastogénico. Las terapias disponibles actualmente son agresivas, se asocian a numerosos efectos adversos, y no son adecuadas para todas las poblaciones. Por ello, se necesitan nuevas herramientas terapéuticas.

Los objetivos de esta tesis doctoral son los siguientes:

- Determinar los medios de diferenciación consenso, mejorarlos y compararlos con los comerciales. Identificar también una línea celular que permita evaluar simultáneamente la osteoblastogénesis y la adipogénesis.
- Estudiar los FTx más relevantes asociados a cambios de metilación durante la osteoblastogénesis en un contexto de diferenciación osteoblástica y adipocítica.
- Estudiar la expresión y/o actividad de los FTx relacionados con la osteoblastogénesis o adipogénesis en alteraciones óseas presentes en las patologías musculoesqueléticas con más prevalencia.
- Identificar potenciales tratamientos para la OH a través de la modulación de los FTx.

La determinación de los medios se realizó en células madre mesenquimales (MSCs) humanas primarias, células tipo osteoblasto humanas primarias, y las líneas de MSCs C3H10T1/2, y hMSC-TERT. Estas células se diferenciaron a osteoblasto y adipocito, siendo estos procesos evaluados mediante la expresión de genes marcadores de osteoblasto y adipocito (RT-PCR), rojo de aceite O y rojo de alizarina. La expresión de los FTx se midió en muestras de tejido óseo y graso maduros, y se correlacionó consigo misma y con la expresión de genes marcadores de osteoblastogénesis y adipogénesis. Seguidamente se

silenció una selección de FTx potencialmente implicados en la osteoblastogénesis (nodo) en los procesos del equilibrio osteoblasto-adipocito. También se midió la expresión de este nodo de FTx en situaciones fisiopatológicas como el sexo, la edad, o la obesidad.

El siguiente paso fue la identificación de una triterapia para la OH. Los efectos de la triterapia en el equilibrio osteoblasto-adipocito se midieron en C3H10T1/2, SaOS2 y células tipo preosteoblasto primarias humanas midiendo la expresión de los genes marcadores de estos destinos celulares mediante RT-PCR. Interesantemente, fuimos capaces de biovalidar el efecto de esta triterapia en células de OH adquirida y células de un caso raro de OH congénita, realizando los mismos análisis previamente hechos. La triterapia además se administró sistémicamente a un paciente de OH congénita tras exéresis de una placa de OH para prevenir recidivas.

La línea celular C3H10T1/2 se evidenció como el modelo celular más adecuado para estudiar el equilibrio osteoblastogénico-adipogénico, combinado con el medio adipogénico consenso suplementado con IGF1 para inducir adipogénesis, y con el medio consenso para inducir osteoblastogénesis. El estado de metilación de los FTx correlacionó con su expresión en hueso, pero no en grasa infrapatelar, y, dentro de aquellos cuyos lugares de unión se encontraban hipermetilados, NRF1, SAP30, SETDB1, SP4, SUZ12 y ZEB1 se identificaron como un nodo de FTx potencialmente reguladores del equilibrio osteoblasto-adipocito. Cuando este nodo se silenció de forma conjunta, la expresión de genes marcadores de adipogénesis disminuyó en un proceso adipogénico. Es más, la relación entre su expresión y la edad se evidenció significativamente ligada al sexo, y su expresión también se relacionó significativamente con un aumento del índice de masa corporal al compararlo con el resto de FTx.

Se demostró que una asociación de dexametasona, indometacina y tiazolidinedionas aumentaba de forma sinérgica y significativa la expresión de los genes marcadores de adipogénesis en C3H10T1/2 y células tipo preosteoblasto primarias humanas. También disminuyó la expresión de genes marcadores de osteoblastogénesis en SaOS2 y células tipo preosteoblasto primarias humanas, y aumentó en estas últimas la expresión de los FTx del nodo. Adicionalmente, en células de OH adquirida y congénita se obtuvieron unos resultados similares. Al administrar la triterapia a un paciente con OH congénita de forma sistémica, se rompió el equilibrio del remodelado óseo empujándolo hacia la resorción.

Afrontando la ausencia de un protocolo optimizado para estudiar el balance osteoblastogénesis-adipogénesis desde un origen mesenquimal común, se estableció un modelo *in vitro* con C3H10T1/2. Este modelo permitió identificar el mecanismo a través del cual un nodo de FTx está implicado en el balance osteoblasto-adipocito. Este nodo también se relacionó con el envejecimiento y la obesidad, situaciones fisiopatológicas relacionadas con la adiposidad ósea. La modulación de la expresión de genes marcadores de osteoblastogénesis y adipogénesis, así como la expresión del nodo, permitieron identificar una triterapia para prevenir y tratar el crecimiento anormal del hueso. Esta triterapia se biovalidó *in vitro* y en un caso clínico con resultados prometedores.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ABSTRACT

Musculoskeletal pathologies are a common denominator in current societies. Their increase along developed countries involves a huge social, sanitary, and economic burden. Bone alterations are present in several of these pathologies, being common lower bone quality, and an indirect reduction of the life expectancy.

Osteoblasts are the cells that perform bone formation. These cells share a mesenchymal origin with adipocytes. This means that an optimal bone formation depends on a right balance between the mesenchymal stem cells differentiation to osteoblast and adipocytes. However, current human mesenchymal stem cells (hMSCs) in vitro differentiation protocols are expensive and hardly reproducible. These cells scarcity and intrinsic variability difficult the development of affordable and reliable method to study osteoblast-adipocyte equilibrium. Osteoblastogenesis-adipogenesis balance rupture is relevant in multiple rheumatic diseases. In this context several signalling pathways (WNT, BMP) web work to sum up the information from the environment and stimuli of mesenchymal cells. Then, they integrate it through transcription factors (TFx) that control the adipogenic or osteoblastogenic process. Their activity is regulated through epigenetics, being DNA methylation the most common mechanism to these modulatory effects. Consequently, TFx acquire a main role in the regulation of osteoblastogenesis and adipogenesis, becoming potential therapeutic targets, or illness markers. One of the diseases that can be approached through TFx modulation is heterotopic ossification (HO). This pathology consists of abnormal bone growth in soft tissues, in a non-proosteoblastogenic environment. The currently available therapies are aggressive, associated to multiple adverse effects, and not suitable for every population. Therefore, new therapeutic tools are needed.

This thesis objectives are the following:

- To determine consensus differentiation media, to improve and compare them with commercial ones, also to identify a cell line to evaluate simultaneously osteoblastogenesis and adipogenesis.
- The study of the most relevant TFx, related to methylation changes in the DNA along the osteoblastogenesis. All of these, in the context of the osteoblastogenic or adipogenic differentiation.
- To study the expression and/or activity of the TFx related to osteoblastogenesis or adipogenesis, in bone alterations due to the musculoskeletal pathologies with higher prevalence.
- Identify potential treatments for HO through TFx modulation.

Media determination was made in primary mesenchymal stem cells (MSCs), primary osteoblast-like cells, and MSCs lines C3H10T1/2, and hMSC-TERT. They were differentiated to osteoblast and adipocyte, being these processes assessed by osteoblastic and adipocytic marker genes expression (RT-PCR) and Oil Red O and Alizarin Red staining. TFx expression was measured in tissue (bone and hoffa) samples, and corelated with themselves, osteoblastogenic and adopogenic marker genes expression. Following a selection of potentially osteoblastogenesis-implicated TFx, the effect of their silencing on osteoblast-adipocyte balance was determined in the differentiation model previously stablished. The

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

next step was to evaluate TFx effects in pathological tissue samples. Tritherapy effects on osteoblast-adipocyte balance were assessed in C3H10T1/2, SaOS2, and pre-osteoblast-like cells by measuring with RT-PCR the expression of osteoblastogenic and adipogenic marker genes. Interestingly, we were able to biovalidate this tritherapy effect in cells from acquired HO and a rare case of congenital HO, performing the same analysis made previously. Tritherapy was administered systemically to a patient of congenital HO after HO bone surgical removal to prevent recurrences.

C3H10T1/2 arose as the most adequate cell model to study osteoblastogenic-adipogenic balance, combined with consensus adipogenic medium supplemented with IGF1 to induce adipogenesis, and with consensus medium to promote osteoblastogenesis. Regarding TFx, methylation correlated with TFx expression in bone but not in hoffa, and between the TFx whose binding sites were hypermethylated, NRF1, SAP30, SETDB1, SP4, SUZ12, and ZEB1 were identified as a node of genes that can potentially be regulators of osteoblast-adipocyte differentiation equilibrium. When these TFx were silenced simultaneously adipogenesis marker genes expression diminished in an adipogenic differentiation. Moreover, their expression trough age was significantly sex-related, as well as their expression with IMC, when compared to the rest of TFx. An association of dexamethasone, indomethacin and tiazolidinediones was proven to synergistically augment adipogenic marker genes expression in C3H10T1/2 and preosteoblastic-like cells, decrease osteoblastic marker genes expression in SaOS2 and preosteoblastic-like cells, and augment the expression of node of TFx expression. Moreover, in HO primary osteoblastic cells the results were almost replicated. When administered this tritherapy to a patient of congenital HO, tritherapy altered the relation between remodelling markers serum concentrations, balancing the equilibrium towards bone resorption.

Facing the absence of an optimised protocol to study osteoblastogenesis-adipogenesis balance from a mesenchymal common origin, it was stablished an *in vitro* model with C3H10T1/2. This model allowed us to identify the mechanism by which a node of TFx is implied in osteoblast-adipocyte balance control. This node was also related with ageing, obesity and these physiopathological situations related-bone adiposity. Osteoblastogenesis and adipogenesis marker genes expression modulation, as well as node expression, allowed to identify a tritherapy to prevent and treat abnormal bone growth. This tritherapy was biovalidated *in vitro* and in a clinical case with promising results.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

INTRODUCCIÓN 5
Fisiología del hueso 7
1. Definición del hueso 7
2. Origen embrionario del hueso 7
3. Hueso laminar 9
3.1 Periostio y endostio 10
4. Osificación 10
4.1. Osificación intramembranosa 10
4.2. Osificación endocondral 11
4.3. Crecimiento radial del hueso 11
5. Componentes óseos 11
5.1. Matriz ósea 11
5.2. Componente celular 12
6. Metabolismo óseo 16
6.1. Remodelado y modelado óseos 16
6.2. El hueso como órgano endocrino 19
6.3. Metabolismo del calcio y el fosfato 21
Patología del hueso 23
1. La inflamación y el hueso 23
1.1. Inflamación crónica 23
1.2. Inflamación aguda 26
1.3. Fármacos antiinflamatorios 28
2. Ruptura de los equilibrios del hueso 29
2.1. Alteraciones del equilibrio osteoblástico-adipocítico 29
2.2. Alteraciones del remodelado óseo 31
2.3. Crecimiento anormal del hueso 34
Regulación de la osteoblastogénesis a través de factores de transcripción 38
1. Factores de transcripción 38
OBJETIVOS 41
MATERIAL Y MÉTODOS 45
1. Cultivos celulares 47
1.1. Línea celular C3H10T1/2 47
1.2. Línea celular hMSC-TERT 47
1.3. Línea celular SaOS2 48
1.4. Línea celular ATDC5 48
1.5. Células madre mesenquimales de médula ósea humanas 49
1.6. Aislamiento y cultivo primario de osteoblastos 49
2. Diferenciación celular 51
3. Tratamientos 52
4. Silenciamiento de genes 53
5. Técnicas colorimétricas 53
5.1. Rojo de alizarina 53
5.2. Rojo de aceite O 54
6. Extracción de ARN 54
7. RT-PCR 55
7.1. RT 55
7.2. PCR 56
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

8. Análisis estadístico 60
9. Revisión de literatura 61
10. Lista de reactivos 62
RESULTADOS 65
Establecimiento de un protocolo estandarizado para el estudio del balance osteoblasto-adipocito 67
1. Medios de diferenciación consenso 67
1.1. Medio de diferenciación adipogénico 67
1.2. Medio de diferenciación osteoblastogénico 71
2. Evaluación de los medios de diferenciación en células mesenquimales 72
2.1. Comparación con medios comerciales en células mesenquimales primarias 72
2.2. Evaluación de la predisposición de células primarias tipo-osteoblasto de pacientes envejecidos a diferenciarse a osteoblasto y adipocito 75
2.3. Líneas de MSCs 78
Identificación de factores de transcripción implicados en la osteoblastogénesis en un contexto articular y patológico 84
1. Identificación de factores de transcripción implicados en la diferenciación osteoblástica 84
2. Factores de transcripción moduladores de la osteoblastogénesis en tejido óseo y graso articular sano y patológico 87
2.1. Expresión de los factores de transcripción en hueso articular y grasa infrapatelar 87
2.2. Correlación entre la expresión de los factores de transcripción y los marcadores de destino celular 91
2.3. Selección de los factores de transcripción objeto de estudio 93
3. Expresión de los factores de transcripción durante la osteoblastogénesis y la adipogénesis 94
4. Silenciamiento del nodo 96
4.1. Silenciamiento de NRF1 96
4.2. Silenciamiento de SAP30 99
4.3. Silenciamiento de SETDB1 102
4 .4. Silenciamiento de SP4 105
4.5. Silenciamiento de SUZ12 108
4.6. Silenciamiento de ZEB1 111
4.7. Silenciamiento conjunto del nodo 114
5. Estudio del nodo en un contexto fisiológico y patológico 119
5.1. NRF1 120
5.2. SAP30 122
5.3. SETDB1 125
5.4. SP4 127
5.5. SUZ12 130
5.6. ZEB1 132
5.7. Nodo 135
Nueva terapia moduladora del metabolismo óseo para el crecimiento anormal de hueso 137
1. Modulación del crecimiento celular de osteoblastos primarios 137
2. Las tiazolidinedionas inhiben la vía WNT de señalización 139
3. Modulación del balance osteoblasto-adipocito en líneas celulares 141
3.1. Modulación del equilibrio en MSCs (C3H10T1/2) 141
3.2. Modulación de la osteoblastogénesis en células preosteoblásticas (SaOS2) 146

4. Modulación del balance osteoblasto-adipocito en células primarias de hueso ... 149
4.1. Expresión del nodo en células primarias de hueso tratadas con la triterapia 153
5. Modulación del balance osteoblasto-adipocito en osificación heterotópica 153
5.1. Osificación heterotópica adquirida 154
5.2. Osificación heterotópica congénita 157
5.3. Tratamiento de un caso clínico de heteroplasia ósea progresiva 159
DISCUSIÓN 161
CONCLUSIONES 175
ANEXOS 179
Índice de figuras 181
Índice de tablas 185
Listado de abreviaturas 186
Dictamen del comité de ética 189
BIBLIOGRAFÍA 191

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

INTRODUCCIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

FISIOLOGÍA DEL HUESO

1. DEFINICIÓN DEL HUESO

El hueso es un órgano rígido que forma parte del endoesqueleto de los animales vertebrados. En el cuerpo humano hay 206 huesos organizados en un esqueleto. Dentro de estos huesos se diferencian dos tejidos, el tejido óseo y la médula ósea. En este órgano se encuentran diversos tipos celulares (osteoblastos, osteocitos, osteoclastos, células de revestimiento, adipocitos, células madre mesenquimales (MSCs por sus siglas en inglés), precursores hematopoyéticos, etc.) que participan en las funciones principales del hueso:

- Función de protección de órganos y sistemas. El cráneo y la columna vertebral protegen al sistema nervioso central, y las costillas y el esternón al corazón y los pulmones.
- Función de movimiento. Los músculos, tendones y ligamentos se insertan en los huesos, ejerciendo éstos como palanca para el movimiento.
- Función de carga. Los huesos soportan la carga ejercida sobre el cuerpo y son capaces de responder ante este estímulo.
- Función de depósito de minerales. El hueso sirve como reserva del 99% del Ca y del 80% del P del cuerpo humano.
- Función hematopoyética. Dentro del hueso se encuentra la médula ósea, donde se producen los precursores hematopoyéticos.
- Función de regulación de la respuesta inmune.
- Función metabólica. El hueso participa en el metabolismo humano no solo controlando la homeostasis de Ca y P, sino como órgano endocrino.

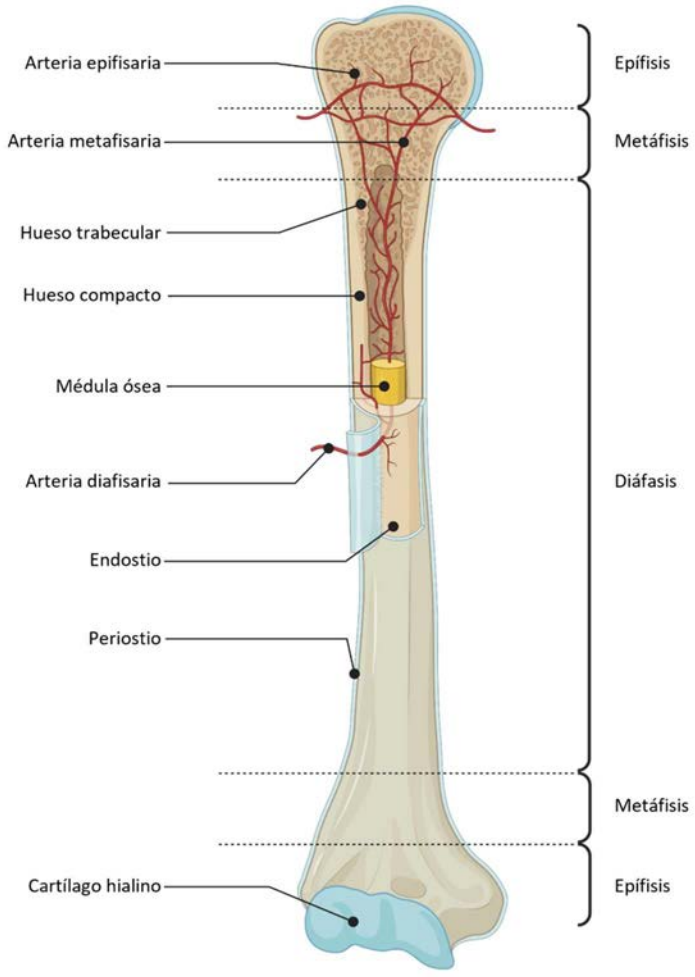
2. ORIGEN EMBRIONARIO DEL HUESO

USC

La mayoría de huesos del esqueleto humano (huesos de las extremidades) proceden del mesodermo de la placa lateral (1,2). No obstante, también pueden provenir de la cresta neural o del mesodermo paraxial. Los huesos del oído

interno, parte del esqueleto craneofacial y el esqueleto axial derivan de las células de estas dos zonas (1,2).

El esqueleto embrionario está formado por el hueso reticular (también llamado inmaduro o primitivo) (1). Este tipo de hueso también se encuentra en las placas de crecimiento o en el callo de las fracturas óseas (1), así como en aquellas patologías donde los osteoblastos forman el osteoide (matriz orgánica del hueso) demasiado rápido (3). Es un tipo de hueso flexible y débil, debido a la desorganización de las fibras de colágeno (4) y a su mineralización irregular (1).



USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 1. Estructura del hueso maduro.

3. HUESO LAMINAR

El hueso maduro o hueso laminar, al contrario de lo que sucede en el reticular, es un tejido altamente organizado, donde las fibrillas de colágeno se encuentran empaquetadas. Este hueso sustituye al hueso reticular durante el crecimiento y las fases tardías de curación de fracturas.

Dentro del hueso maduro se diferencian dos tipos de hueso:

- Hueso cortical: representa el 80% del peso del hueso y se caracteriza por una baja porosidad y una alta resistencia a las fuerzas compresivas o de torsión. Las osteonas son la unidad estructural de este tipo de hueso, y forman cilindros longitudinales en las diáfisis, paralelos al eje largo del hueso (Figura 2.).

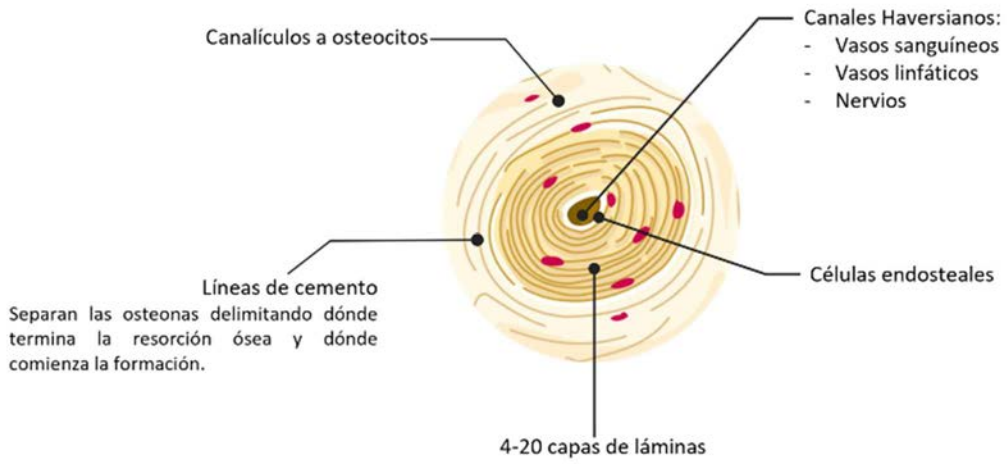


Figura 2. Estructura de una osteona

- Hueso esponjoso: representa el 20% del hueso y posee una porosidad del 50-90%. Se caracteriza por una alta actividad metabólica y una elevada tasa de remodelado. Ante fuerzas mecánicas es capaz de responder permitiendo la absorción de las cargas y la deformación del hueso.

En el hueso trabecular las láminas se distribuyen en paquetes de hojas semicirculares. En este tejido hay más células, más vascularización, más actividad metabólica y, en lugar de los canales Haversianos, existen sinusoides que conectan las estructuras óseas con la médula.

3.1 Periostio y endostio

Como ya se ha descrito, el hueso laminar está formado por hueso compacto y hueso trabecular. El hueso compacto se sitúa en el exterior protegiendo así al trabecular y a la médula ósea. En la zona externa del hueso compacto se encuentra el periostio, que recubre la superficie externa. Este tejido está formado por dos finas capas, siendo la externa prácticamente acelular. Esta capa recubre el hueso y la cápsula articular sirviendo así de nexo entre los diferentes huesos. Aquí se insertan los tendones y ligamentos. En la segunda capa más interna se encuentra el cambium, donde se encuentran las células osteoprogenitoras y el plexo vascular periosteal. En el hueso adulto el cambium propiamente dicho, así como su capacidad osteoprogenitora, son prácticamente indetectables. En el periostio existen células capaces de resorber y formar hueso, necesarias para la formación y estabilidad del callo óseo cuando tiene lugar una fractura. El periostio se comunica con la superficie del hueso través de las fibras de Sharpey, formadas por colágeno I (Col I). El endostio está conectado con el periostio a través de los canales de Volkman. Este tejido cubre las superficies internas y los canales de Volkman. En el endostio se encuentran células osteoprogenitoras y vasculares.

4. OSIFICACIÓN

El paso de hueso reticular a hueso laminar se realiza a través del proceso de osificación, el cuál es diferente en huesos planos y en huesos largos. Los huesos planos son el cráneo, las costillas y los omóplatos, siendo el resto huesos largos.

4.1. Osificación intramembranosa

Es la osificación que tiene lugar en los huesos planos. Es una osificación espontánea a partir de un centro de osificación en la matriz extracelular que acaba por dar lugar al hueso. También ocurre en fases tempranas de curado de fracturas o en casos de osteogénesis por distracción.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

4.2. Osificación endocondral

Esta osificación tiene lugar en la metáfisis de los huesos largos, en la placa de crecimiento, y en general en el curado natural de las fracturas óseas (5). La osificación endocondral se genera a partir de un tejido cartilaginoso previamente establecido. En ella se distinguen varios pasos:

- Fase proliferativa: existe una proliferación de condrocitos en el cartílago hialino.
- Fase hipertrófica: aumenta la expresión de fosfatasa alcalina (ALPL).
- Fase apoptótica: en la zona calcificada se produce la apoptosis de los condrocitos y aumenta la expresión de factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, por sus siglas en inglés).
- Migración de los osteoprogenitores y formación de hueso por parte de los osteoblastos.

4.3. Crecimiento radial del hueso

Es el crecimiento del hueso sobre su eje transversal, a nivel del periostio. Suele ir acompañado de resorción en el endostio y lo llevan a cabo los osteoprogenitores presentes en el cambium.

5. COMPONENTES ÓSEOS

5.1. Matriz ósea

La matriz ósea supone la mayor parte del tejido óseo. Está compuesta por un elemento orgánico (osteoide) y por un elemento inorgánico.

Dentro del componente orgánico responsable de la forma del hueso y de su resistencia a fuerzas de tensión, el 90% es Col I (6), siendo el 10% restante otros colágenos (III o V), proteoglicanos, glucoproteínas y otros factores. Dentro de estos factores se encuentran las proteínas morfogénicas del hueso (BMPs, por sus siglas en inglés), el factor de crecimiento transformante-β (TFGβ, por sus siglas en inglés), las interleucinas 1 y 6 (IL1 e IL6), la osteocalcina (BGLAP), la osteoactivina (GPNMB) y la osteopontina (SPP1) (1,7).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Dentro del componente inorgánico de la matriz los elementos más presentes son Ca (99%) (1) y P (en la forma PO_4) (85%) (1) que forman una estructura cristalina semejante a la hidroxiapatita, $[Ca_{10}(PO_4)_6 6(OH)_2]$ (7). Esta estructura confiere fortaleza y resistencia al hueso, así como rigidez y resistencia a fuerzas de compresión. Otros elementos del componente inorgánico son el Mg y el Na, que representan entre un 40 y un 60% del total (1).

La matriz madura durante el crecimiento del hueso. Este proceso se relaciona con un aumento de algunos de los factores de crecimiento citados previamente (ALPL, BGLAP, SPP1) que regulan la formación y disposición de los cristales de hidroxiapatita. Esta formación tiene lugar en el interior de vesículas extracelulares producidas por condrocitos y osteoblastos, donde se generan altas concentraciones de Ca y PO_4 que permiten su cristalización (8).

5.2. Componente celular

Existen cuatro tipos celulares propiamente óseos. Los osteoblastos, los osteoclastos, los osteocitos, y células de revestimiento óseo. El tipo celular más común, que representa el 95% de la celularidad del hueso, son los osteocitos. No obstante, los osteoblastos y los osteoclastos tienen más implicación en el metabolismo óseo.

5.2.1. Osteoblastos

Los osteoblastos son las células formadoras de hueso, controlan la osteoclastogénesis y su función, así como la formación de matriz mineral ósea (9), siendo las células más metabólicamente activas del hueso. Los osteoblastos son células planas, cuboides al activarse, y mononucleares que, en estadios tardíos de maduración, se alinean sobre las superficies del hueso. Derivan de MSCs de la médula ósea, aunque también pueden proceder de los osteoprogenitores del endostio o los canales óseos. Estas células reciben señales para migrar, proliferar, y diferenciarse a osteoblastos. Interesantemente, estas señales pueden proceder de los propios osteocitos. Una de las vías de señalización implicadas en este proceso es la vía WNT/β-catenina (Wingless/INT) (10) que puede estimular o inhibir diferentes pasos de la diferenciación osteoblástica (11,12).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.2.1.1. Equilibrio osteoblástico-adipocítico

La mayoría de los osteoblastos presentes en el hueso derivan de la diferenciación de MSCs a este destino celular. Estas células no solo se pueden diferenciar a osteoblasto, sino que también lo pueden hacer a adipocito, condrocito, miocito u otros tipos celulares. Interesantemente, la diferenciación osteoblástica y la adipocítica son procesos opuestos e íntimamente relacionados. Esto implica que la formación de hueso depende del correcto equilibrio entre la osteoblastogénesis y la adipogénesis de MSCs. Consecuentemente, un aumento de la adiposidad ósea se ha relacionado con la pérdida ósea descrita en numerosas situaciones fisiopatológicas como la osteoporosis, la osteopenia, la obesidad o el envejecimiento (13–16).

Actualmente se sabe que la adipogénesis y la osteoblastogénesis son procesos competitivos y mutuamente controlados (17). Por ello, la mayoría de factores proadipogénicos actúan como inhibidores de la osteoblastogénesis y viceversa (18). La diferenciación de MSCs a osteoblasto y adipocito se ve controlada por numerosos factores y vías de señalización. Estas vías pueden afectar a uno u otro destino celular, a ambos, o a la pérdida de mesenquimalidad necesaria para el éxito de los procesos de diferenciación.

- Vía BMPs: BMP4 promueve la adipogénesis de las MSCs (19) de forma individual. BMP2 es un factor anabólico del hueso que, en determinadas situaciones, induce adipogénesis asociado a agonistas del receptor γ activante de la proliferación de peroxisomas (PPARG) (20). Se ha visto que esta última en función de su concentración puede promover ambas diferenciaciones en células de ratón (21). De hecho, esta vía puede regular factores de transcripción proosteoblásticos (factor de transcripción relacionado con RUNT tipo 2 (RUNX2)) y proadipogénicos (PPARG) (22,23).

- Vía WNT: está ampliamente demostrada su capacidad promotora de la osteoblastogénesis (3,24) e inhibidora de la adipogénesis (24,25). Se ha relacionado una reducción de su agonista Wnt10b con el aumento de la edad, que podría explicar el aumento de adipogénesis asociada (26). También se ha visto en los preadipocitos 3T3-L1 que existe una regulación recíproca entre la vía WNT y PPARG a la hora de controlar la adipogénesis (27). Adicionalmente,

se ha descrito que la activación de la vía WNT también inhibe la osteoclastogénesis alterando el ratio entre el ligando del factor nuclear κβ y la osteoprotegerina (RANKL/OPG) (24)

- Vía Notch: su expresión se ve bloqueada por PPARG (28), siendo esencial para la correcta adipogénesis. Su efecto sobre la osteoblastogénesis no es consistente por lo que se debe investigar más a fondo. Se ha descrito un papel inhibidor de este proceso a través de la inhibición de la vía WNT, así como un papel promotor de la osteoclastogénesis (29). No obstante, también se ha estudiado su potencial inducción de la osteoblastogénesis a través de las BMPs (30).

- Hedgehogs: aumentan durante la diferenciación osteoblastogénica (31) y disminuyen durante la adipogénica (32). Se ha descrito recientemente su implicación en la consolidación de fracturas a través de osificación endocondral (33).

No solo vías de señalización pueden afectar a la regulación de la diferenciación de MSCs. Los propios procesos se pueden regular entre ellos. La expresión de SPP1 por parte de los propios osteoblastos aumenta la osteoblastogénesis e inhibe la adipogénesis y su expresión se ha relacionado inversamente con la adiposidad in vivo (34). La matriz extracelular también afecta a este proceso. Sus alteraciones pueden controlar los cambios celulares necesarios para ambos procesos de diferenciación (35).

5.2.2. Osteocitos

Los osteocitos representan el 95% de las células del hueso y se encuentran embebidos en la matriz de este tejido (1). Durante el proceso de síntesis de la matriz ósea, entre el 50 y el 70% de los osteoblastos sufre apoptosis. Sin embargo, otro porcentaje importante se diferencia a osteocitos. Éstos son células planas con múltiples prolongaciones. Los osteocitos son células mecanosensibles (36) y sus mecanoreceptores responden a microdistorsiones de la matriz por diferencias de carga mecánica (7). Así, los osteocitos indican a los osteoclastos dónde y cuándo resorber hueso, y a los osteoblastos dónde y cuándo formarlo. Para completar esta función forman una red (7) metabólica y

eléctrica a través de los canalículos óseos donde sus prolongaciones citoplasmáticas se tocan formando uniones tipo gap (37,38). Regulando de esta forma el remodelado óseo los osteocitos conservan la matriz ósea y controlan la homeostasis del Ca (1).

5.2.3. Células de revestimiento óseo

Aquellos osteoblastos que ni continúan su diferenciación a osteocito ni entran en apoptosis se convierten en células de revestimiento óseo (39,40). Son células planas, largas y estrechas. Estas células están al mismo tiempo separadas y en contacto con el hueso mineralizado. Están separadas del hueso mineralizado por las líneas de cemento que marcan los límites de trabajo de los osteoclastos y los osteoblastos (7), y están en contacto con los osteoblastos y osteocitos por uniones adherentes y de tipo gap respectivamente (8,41). Las células de revestimiento óseo son capaces de secretar colagenasas que destruyen la capa de tejido fibroso con el fin de aumentar la resorción ósea (7). También están implicadas en la diferenciación de células madre hematopoiéticas, sirviéndoles de anclaje y participando en el mantenimiento de su mesenquimalidad (41).

5.2.4. Osteoclastos

Los osteoclastos son células polinucleares (con más de 3 núcleos) formadas por la fusión de monocitos/células de la estirpe de los macrófagos (42) de la médula ósea. Estas células se caracterizan por poseer un borde en cepillo a través del cual realizan su función resortiva ósea. La osteoclastogénesis está regulada por numerosos factores, entre los que destacan los producidos por los osteoblastos, capaces de controlar estrechamente la diferenciación de osteoclastos (43). Uno de ellos es RANKL. En presencia del factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF, por sus siglas en inglés) este factor aumenta la osteoclastogénesis (44,45). La situación opuesta se da con la OPG, un factor que bloquea este proceso (44). Se acostumbra a emplear la ratio entre estes dos factores como marcador del remodelado óseo. Los osteoclastos se encuentran en la superficie ósea, en las lagunas óseas donde ejercen su efecto de resorción del hueso durante el remodelado del mismo.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6. METABOLISMO ÓSEO

6.1. Remodelado y modelado óseos

El remodelado óseo es el proceso por el cual el esqueleto humano se renueva completamente cada siete años. El hueso es un tejido vivo y dinámico que se encuentra en constante remodelación. Esta renovación la realizan las unidades de remodelado óseo, formadas por osteoclastos y osteoblastos. La diferencia entre el remodelado y el modelado es que en el primero los osteoclastos y osteoblastos trabajan en una misma localización y de forma concatenada, causando de esta forma una renovación del hueso. En cambio, en el modelado óseo el trabajo de ambos tipos celulares es simultáneo y en diferentes localizaciones del hueso. Este proceso da lugar al crecimiento del hueso y tiene lugar como respuesta a las diferentes cargas mecánicas ejercidas sobre el hueso (ley de Wolff) (7).

El remodelado óseo comienza antes del nacimiento y continúa hasta la muerte. No obstante, la dirección de este equilibrio varía a lo largo de la vida (8). Las fases del remodelado óseo son las siguientes (46,47) (Figura 3.):

- Una vez iniciado el proceso de remodelado por el estímulo pertinente, las células de revestimiento óseo se separan de la superficie del hueso y forman un espacio llamado dosel óseo (48,49) donde tiene lugar el remodelado. Estas células secretan colagenasas y metaloproteinasas (MMPs) y provocan la exposición de la matriz mineral ósea eliminando fibrillas de colágeno no mineralizadas (39,40,50). En la región del dosel existe un ambiente controlado con las concentraciones de factores y citoquinas necesarias para atraer a precursores osteoblasto y osteoclásticos (49,51).
- Este estímulo provoca la fusión de células mononucleares para diferenciarse a osteoclasto. Este proceso dura entre 2 y 4 semanas y está regulado por la ratio RANKL/OPG, así como citoquinas como la IL1, IL6, por el M-CSF, la hormona paratiroidea (PTH), la 1,25-OH vitamina D, y la calcitonina (52,53).
- El osteoclasto libera iones H^+ a través de su borde en cepillo acidificando así el pH de la laguna de resorción (54). También libera

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

fosfatasa ácida resistente al tartrato, catepsina K, MMP9 y gelatinasa (55). De esta forma se produce la descalcificación del hueso y se digieren los colágenos de la matriz (7), liberándose en este paso el telopéptido reticulante C-terminal del Col I (CTX-I por sus siglas en inglés) (56).

- La acidificación provoca la liberación de citoquinas y otras moléculas que se encontraban embebidas en la matriz. Las citoquinas liberadas inhiben la osteoclastogénesis posterior y actúan como señales para la actividad de los osteoblastos.
- Tras la apoptosis de los osteoclastos las células mononucleares terminan la fase de resorción y comienza la de formación ósea (57,58). Se han propuesto varias señales acopladoras de estos dos procesos entre las que se encuentran el TGFβ, los factores de crecimiento insulínicos 1 y 2 (IGF1 e IGF2), las BMPs, y los propios osteoclastos (59–61).
- Los osteoblastos forman nueva matriz ósea en la laguna generada por los osteoclastos en el caso del remodelado. Este proceso dura entre 4 y 6 meses. En él los osteoblastos sintetizan colágenos y otras proteínas no colaginosas, organizan sus fibrillas y se encargan de mineralizar el osteoide liberando vesículas con Ca y PO_4 (7,8). Durante la organización de las fibrillas de Col I se libera al suero el propéptido de extensión N-terminal del Col I (PNPI por sus siglas en inglés) (56).
- Una vez terminado el remodelado, las células de revestimiento cubren la superficie ósea con una fina capa de colágeno (39,40,50).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

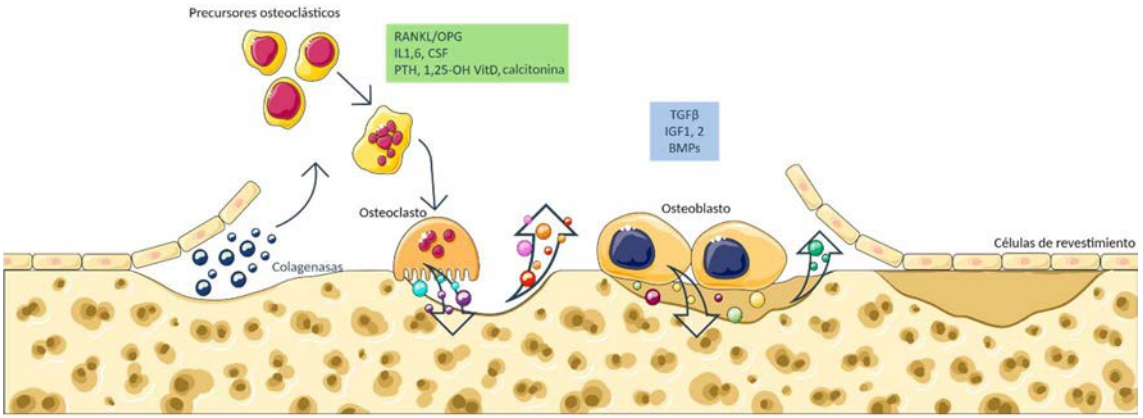


Figura 3. Fases del remodelado óseo

No obstante, el remodelado óseo no es igual en todas las zonas del hueso. Por ejemplo, en el hueso del periostio existe más formación que destrucción de hueso, ocurriendo lo contrario en el endostio y en el hueso trabecular. Esto último sugiere una mayor actividad metabólica en el hueso trabecular que en otras zonas del hueso (8). De la misma forma, la formación de hueso puede tener lugar en regiones externas al esqueleto en situaciones patológicas. Es lo que se llama osificación heterotópica (OH).

Reguladores del remodelado óseo a nivel local		
Factores de crecimiento		Citoquinas
IGF1 y 2 (63) TGFβ (64) BMPs (65) Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (66) Factor de crecimiento fibroblástico (FGF) (67) VEGF M-CSF Factor de necrosis tumoral (TNF)	Proteínas de matriz (62)	IL1 (68) IL6 (42) IL11 Prostaglandinas (69) Leucotrienos

Tabla 1. Reguladores del remodelado óseo a nivel local

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.1.1. Marcadores de remodelado óseo

Marcadores de formación ósea	Marcadores de resorción ósea
ALPL. Aumenta su concentración plasmática o sérica en Paget, osteomalacia y formación de hueso ectópico. BGLAP PNPI. Aumentan en todas las situaciones de formación de hueso (crecimiento, Paget…)	Péptidos con hidroxiprolina Glucósidos de hidroxilisina Reticulantes de pirolidina Fosfatasa ácida V

Tabla 2. Marcadores de remodelado óseo

El Comité Conjunto sobre Metabolismo Óseo de la Fundación Internacional de Osteoporosis y la Federación Internacional de Química Clínica y Medicina de Laboratorio establecieron al PNPI y al βCTX como marcadores del remodelado óseo (70). Siendo el primero indicador de formación ósea y el segundo de resorción. Por ello, ambos marcadores se han propuesto como indicadores diagnósticos para patologías donde se ve alterado el remodelado óseo, ya sea por un aumento en la formación (osificación heterotópica) (71) o en la resorción (osteoporosis) (56).

6.2. El hueso como órgano endocrino

El concepto clásico del tejido óseo como mero tejido estructural y de almacenamiento de minerales sujeto a influencias metabólicas externas ha quedado en desuso. Desde el descubrimiento de las osteoquinas, se puede considerar al hueso como un órgano endocrino. Las osteoquinas son proteínas secretadas por el propio hueso con capacidad para regular diferentes funciones o sistemas del organismo, como la ingesta, el sistema inmune, el metabolismo glucídico, etc. Entre las diferentes osteoquinas destacan: la lipocalina tipo 2 (LCN2), la BGLAP y el factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF23).

La LCN2 (también llamada proteína super inducible 24, siderocalina, lipocalina relacionada con neu, lipocalina asociada con la gelatinasa de los neutrófilos o uterocalina) es una molécula secretada por varios tejidos incluido el hueso. Aunque tradicionalmente se ha considerado una adipoquina, se ha demostrado que su expresión por parte del hueso es mayor que la expresión por parte del tejido adiposo blanco (72). La LCN2 es un potente

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

inmunomodulador (73), regula la ingesta a nivel central (72), así como el metabolismo glucídico (74). Ésta se puede controlar por varios factores, incluyendo los inflamatorios, catabólicos o anabólicos (75), siendo los osteoblastos las células productoras, responsables del 67% de la LCN2 sérica (72).

Concretamente, la expresión de LCN2 aumenta en respuesta a numerosas citoquinas o compuestos proinflamatorios, como interferón γ (76), TNF (77), óxido nítrico (78,79), agonistas del receptor 4 de tipo toll (79), y las interleucinas 1α (80), 1β (75,79,81,82), 6 (83), 9 (84), 17 (85), y 22 (86). Lo mismo ocurre con algunos agentes antiinflamatorios como los corticoides (75,80,87) o metabólicos como las adipoquinas (88), el ácido retinoico (89) o la insulina (90). No solo estos factores, pero también las hormonas esteroideas (91), la esfingosina-fosfato I (92), la proteína Bcr-Alb (93) y el receptor de tirosina-quinasa ERBB2 (94) aumentan la expresión de LCN2. Igualmente, la concentración de esta osteoquina aumenta en situaciones patológicas tales como el cáncer (95), procesos infecciosos (82,83), hipoxia (96), anemia (97), obesidad (77), estrés (98–100), ausencia de carga mecánica (101) y radiación (102). En el lado opuesto, la expresión de LCN2 se ve disminuida como respuesta a otros factores como IL3 (103), factores de crecimiento (75), estrógenos (104), carga mecánica (101) o agonistas de PPARG (77,105).

La BGLAP es una de las proteínas no colaginosas más importante, producida por el osteoblasto. Al igual que la LCN2, se expresa mayormente a partir de los osteoblastos y actúa como una hormona en otros tejidos como el adiposo, hepático, muscular, pancreático o cerebral (106). La mayoría de la BGLAP se encuentra embebida en la matriz del hueso debido a su alta afinidad por la hidroxiapatita (107). En el momento de resorción ósea esta proteína se libera pasando así al torrente sanguíneo donde ejerce su función, siendo una de las más relevantes la reguladora del metabolismo glucídico (108). La expresión de BGLAP está relacionada con la insulina, de forma que una hormona controla la expresión de la otra (109).

El papel del FGF23 es la regulación de la concentración sérica del fosfato inorgánico (P_i) y la vitamina D. Identificada como hormona producida por el hueso desde hace mucho tiempo, son los osteoblastos y los osteocitos los tipos

celulares encargados de su producción (110,111). Debido a su papel como regulador de la homeostasis de los minerales, ejerce su efecto principalmente en los riñones (112).

Variaciones en la cantidad de Pi_i ingerido en la dieta correlacionan positivamente con la concentración de FGF23 (113), pero no influyen directamente en su expresión por parte del hueso (114). De la misma forma, el tratamiento con $1,25(OH)_2$ Vitamina D aumenta la expresión de FGF23 (115,116). Al igual que con la LCN2, citocinas inflamatorias como IL1β, o TNF también modulan la expresión de esta hormona (117), así como bajos niveles de hierro (118). Se han sugerido otros moduladores de los niveles de FGF23, como la fosfoproteína 1 de matriz de dentina o la PTH, aunque no está claro su papel. La expresión de FGF23 se encuentra aumentada en la raquitismo hipofosfatémico autosómico recesivo (tipos 1 y 2), así como en la osteomalacia tumoral (119,120).

6.3. Metabolismo del calcio y el fosfato

Tanto el Ca como el P son dos elementos fundamentales para el cuerpo humano, por lo que es imprescindible mantener sus concentraciones estables. El esqueleto no sólo actúa como reservorio para ambos elementos (en forma de cristales de hidroxiapatita), sino que también regula su homeostasis. El mecanismo principal a través del cual los huesos controlan este proceso es el remodelado óseo. Durante la resorción ósea se liberan ambos iones al torrente sanguíneo, y se incorporan de nuevo al hueso embebiéndose en la matriz durante la formación ósea.

El eje PTH-Vitamina D es el encargado de controlar que la concentración plasmática de Ca se mantenga dentro de los rangos fisiológicos. Para ello, este eje activa el remodelado óseo. Debido a estas acciones análogos de la PTH y de la vitamina D se utilizan en la práctica clínica como tratamientos para la osteoporosis por su efecto neto osteoformador. A pesar de ello, el efecto neto positivo de la PTH sobre el hueso depende de la dosis y pauta del tratamiento (121).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El mismo eje que controla la homeostasis cálcica es el encargado de controlar la homeostasis del P, junto con el FGF23, como ya se ha descrito previamente.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

PATOLOGÍA DEL HUESO

1. LA INFLAMACIÓN Y EL HUESO

La inflamación se ha relacionado íntimamente con el metabolismo óseo (122). Existe cierta controversia acerca de esta relación puesto que, aunque es sabido que en patologías reumáticas inflamatorias como la artritis reumatoide existe una pérdida de hueso asociada a la inflamación, también es necesario cierto grado de inflamación para consolidar correctamente las fracturas óseas. Estas divergencias son debidas a las diferencias entre la inflamación aguda y controlada que tiene lugar tras una fractura ósea respecto a la inflamación crónica y sin regular observada en las patologías reumáticas y/o autoinmunes (123).

1.1. Inflamación crónica

Se ha descrito previamente que, en aquellas enfermedades con inflamación sistémica y crónica, como la artritis reumatoide, pancreatitis u otras, el ambiente inflamatorio contribuye a la reducción de la densidad mineral ósea y, por lo tanto, al desarrollo de la osteoporosis (124,125). También está ampliamente aceptado que la cantidad excesiva de citocinas proinflamatorias en estas patologías promueve la osteoclastogénesis (124). No obstante, la relación entre un metabolismo óseo alterado y la inflamación no se limita a enfermedades típicamente inflamatorias. De hecho, esta relación también se ha observado en ciertas enfermedades metabólicas como la obesidad (126) o la diabetes mellitus tipo II (127). La conexión entre la inflamación y el metabolismo óseo se ha evidenciado en diferentes modelos animales de osteoporosis donde la deleción del receptor para citocinas inflamatorias clave, como la IL1 o el TNF, reduce la pérdida ósea de forma dramática (128).

El crecimiento normal del hueso se ve reducido en un alto porcentaje de niños con patologías inflamatorias como la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa (129). En un modelo de colitis de ratón se ha demostrado que el 40% de esta inhibición del crecimiento se debe a la propia inflamación de la enfermedad (130). Las citoquinas inflamatorias pueden ejercer su efecto

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

perjudicial en el hueso de forma individual o sinérgica (131). Concretamente, el TNFα afecta al crecimiento óseo directamente a través de la placa de crecimiento y el tratamiento con su inhibidor revierte esta inhibición (132).

No solo en el crecimiento longitudinal del hueso, la inflamación crónica también condiciona la correcta consolidación de fracturas óseas (133–135). En la obesidad, donde se ha demostrado una peor evolución de las fracturas óseas en ratones, se observó una menor concentración de factores de crecimiento y mayor de citoquinas inflamatorias (TNFα) en plasma (136). De la misma forma, se ha asociado el envejecimiento con una peor consolidación de fracturas (137–139). Es interesante el hecho de que la inflamación que se observa en grandes traumatizados o politraumatizados, aun siendo aguda, ocurre de una forma descontrolada, afectando igualmente a la correcta resolución de la fractura (140).

Existe un mecanismo de regulación positiva entre la inflamación y la destrucción del hueso, donde juega un papel importante la activación del inflamasoma (141). Tras su activación, la ratio de producción de RANKL/OPG aumenta en osteoblastos, induciendo así la osteoclastogénesis (142), y disminuye la expresión de ALPL, RUNX2 y BGLAP (143). Esta activación del inflamasoma se ve regulada por la vía WNT de señalización (144,145).

Las citoquinas inflamatorias también son parte efectora en el efecto deletéreo de la inflamación en el metabolismo óseo. La exposición prolongada y sistémica a TNFα en ratones provoca síntomas óseos semejantes a los de la artritis reumatoide (146). Esta citoquina, junto con otras, como la IL1 o la IL6, afectan al remodelado óseo creando una disrupción de este equilibrio en favor de la resorción del hueso. Estas citoquinas estimulan la secreción de RANKL por parte de los osteoblastos (124,147). La IL1β, citoquina con efectos sinérgicos al asociarse con TNFα (148), promociona la osteoclastogénesis de forma directa e indirecta (68,149). La IL18, en cambio, puede estimular o inhibir este proceso en función del tipo celular sobre el que actúe (150,151).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.1.1. La artrosis

Actualmente la artrosis es la enfermedad reumática más prevalente en el mundo, siendo una causa principal de dolor e incapacidad. Esta enfermedad se caracteriza por el estrechamiento del espacio articular como consecuencia la degradación del cartílago en este área (152). No obstante, el cartílago no es el único tejido afectado, sino que toda la articulación se ve afectada. En la artrosis se pierde la arquitectura articular (153), y la integridad del hueso se ve comprometida (154).

En esta enfermedad se observa una inflamación crónica local afectando a una o varias articulaciones simultáneamente. El componente inflamatorio de esta patología ha sido ampliamente descrito, y citoquinas como la IL1β son juegan un papel determinante en su etiología (155). Estas moléculas afectan a la unidad funcional formada por el cartílago articular y el hueso subcondral (155,156), provocando cambios en el metabolismo osteoblástico y en la relación entre ambos tejidos (155). La expresión de IL1β se ve mediada por las alteraciones bioquímicas y de carga mecánica que tienen lugar en la articulación artrósica. Estas modificaciones no solo afectan a la expresión de mediadores inflamatorios, sino que también inducen la expresión de factores catabólicos (157,158). De hecho, los mediadores inflamatorios y catabólicos expresados en el cartílago pueden ejercer su efecto en el hueso subcondral y viceversa (156,159,160).

La unidad funcional cartílago-hueso subcondral ejerce una acción conjunta para controlar las diferencias de carga mecánica que surgen con el movimiento (normal o anormal) de la articulación, provocando cambios bioquímicos y estructurales en el hueso subcondral que, simultáneamente, afectan a la homeostasis del cartílago (158,161–163). Por ello, la vía WNT, estrechamente vinculada a la carga mecánica, juega un papel importante en esta patología y, como se ha visto previamente, también puede verse afectada por las respuestas inflamatorias (144,145). Las disrupciones metabólicas causadas por esto afectan al remodelado del hueso subcondral (157,158), que puede mostrar zonas escleróticas y osteoporóticas en una misma articulación (154,164)

Otra de las patologías inflamatorias íntimamente relacionada con la artrosis es la obesidad. La artrosis es un factor determinante para el aumento de peso, puesto que el dolor e incapacidad causados por la enfermedad desembocan en un estilo de vida sedentario, factor de riesgo para la obesidad (153,165). Interesantemente, la relación entre ambas patologías es circular, puesto que el aumento de peso y el síndrome metabólico asociado a la obesidad contribuyen al aumento de carga mecánica y a alteraciones bioquímicas típicas de la artrosis (166), con los correspondientes efectos deletéreos asociados al hueso.

1.2. Inflamación aguda

La inflamación aguda y controlada tiene lugar, principalmente, durante la primera fase de la consolidación de fracturas. Este proceso consta de varias fases: fase inflamatoria, fase de reparación, y fase de remodelado óseo (167). Durante la fase inflamatoria, se distinguen dos procesos principales, la fase aguda y la fase de resolución de la inflamación.

- Fase aguda: se inicia justo después de la fractura.
  - Tras una factura se rompen los vasos sanguíneos y se produce un hematoma. Éste se caracteriza principalmente por la presencia de fibrina, que servirá en fases posteriores como andamiaje para la reparación del tejido óseo (168).
  - En esta fase se liberan quimioquinas y citoquinas inflamatorias con el fin de reclutar células inflamatorias al lugar de la lesión (169). Este proceso favorece la diferenciación de monocitos a macrófagos y la liberación de moléculas proinflamatorias como IL1 o TNFα (170).
- Fase de resolución de la inflamación: tiene lugar inmediatamente después de la fase aguda para asegurar un ambiente proosteogénico. Los niveles de la mayoría de los mediadores inflamatorios disminuyen a niveles basales en esta fase (171,172).
  - Las células y moléculas proinflamatorias presentes en la lesión inician esta fase (173). La IL6 induce la secreción de IL10 (174), una citoquina antiinflamatoria que actúa sobre los

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

macrófagos (175), y de TGFβ1 (176). Los factores de crecimiento también tienen un papel relevante en esta fase. En concreto, TGFβ1 y 3 o IGF1 regulan la inflamación en el tejido óseo (177–180).

- TNFα e IL6 promueven la migración de MSCs al lugar de la lesión (181,182). De hecho, en ratones que no expresan alguna de estas citoquinas la consolidación ósea se encuentra disminuida (183). Curiosamente, el inflamasoma tiene un papel fundamental en la resolución de fracturas y la formación de hueso (184). Esto coincide con el hecho de que el control de la inflamación es vital para el correcto funcionamiento de este proceso, siendo igual de perjudiciales el exceso y el defecto de activación inflamatoria (183,185).

En concreto, varias citoquinas inflamatorias promueven la expresión de marcadores osteogénicos o activan la señalización de rutas que promueven este proceso. Se ha demostrado que tanto TNFα como IL17 inducen la expresión génica de BMP2 y RUNX2, y aumentan la señalización de la vía WNT (186). Particularmente, esta vía de señalización, así como la vía de las BMPs, se activa bien por procesos inflamatorios, bien por activación mecánica (187). En el caso del TNFα existe una hipótesis que relaciona su expresión con el efecto de la inflamación en el hueso, la hipótesis de freno de TNFα. Esta hipótesis plantea que el efecto negativo del TNFα sobre el hueso es debido a que aumenta la expresión de dickkopf1 (DKK1), un inhibidor específico de la vía WNT, y, curiosamente, el tratamiento con anti-TNF reduce la formación de hueso (188). No obstante, Li et al (189) demostraron que el efecto del TNFα en el hueso depende de su concentración, así como de la duración de su acción. Así, una dosis baja de esta citoquina activó la señalización de la vía WNT sin afectar a la expresión de DKK1, ocurriendo lo opuesto con dosis elevadas o con tratamientos de corta duración (189).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.3. Fármacos antiinflamatorios

1.3.1. Antiinflamatorios esteroideos (corticoides)

En la práctica clínica los antiinflamatorios corticoides no se prescriben en pacientes con patologías óseas (190). De hecho, están indicados para el

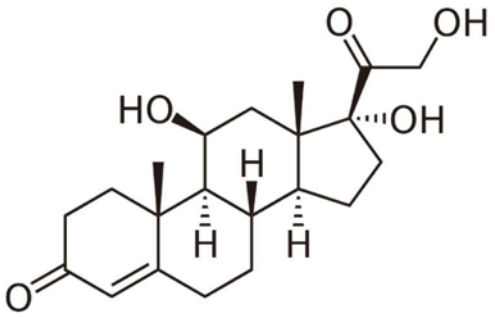


Figura 4. Estructura molecular de un corticosteroide

tratamiento de la FOP (191). Los efectos perjudiciales sobre el hueso de este grupo terapéutico se han evidenciado tanto en humanos (menor densidad mineral ósea, necrosis de cabeza de fémur) (192,193) como en ratones (menor osteogénesis y fuerza mecánica en el lugar de fractura) (194–196).

1.3.2. Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

Los AINEs son fármacos inhibidores de la enzima ciclooxigenasa (COX), y pueden ser específicos de COX2 (celecoxib) o inespecíficos, e inhibir COX1 y 2 (ibuprofeno, indometacina). Zhang et al. demostraron que COX2 es necesaria tanto para la correcta función de los osteoblastos, como para la diferenciación de MSCs a este tipo celular (197). Este efecto se ve mediado por las prostaglandinas producidas por COX2. Estas moléculas se ven implicadas en procesos de osificación endocondral y en caso de fractura dirigen las MSCs al sitio de fractura y favorecen la angiogénesis. (198–200) Asimismo, las prostaglandinas producidas por COX2 también participan en la osificación intramembranosa (promueven la actividad de osteoblastos y osteoclastos *in vivo* e *in vitro*) (69,201–203). De esta forma, la inhibición farmacológica de la acción

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de esta enzima puede afectar al crecimiento óseo y a la correcta consolidación de fracturas (204,205).

No obstante, se han observado diferencias entre aquellos AINEs específicos e inespecíficos. Los no específicos no llegan a parar la formación del hueso, sino que frenan este proceso, puesto que su inhibición de COX2 es de menor magnitud (206).

Considerando lo expuesto, los AINEs se han usado en el tratamiento y prevención de la formación excesiva de hueso ectópico (191), como puede ser la OH tras cirugía de cadera (207). En concreto, la indometacina es el fármaco más empleado para este tratamiento. Su efecto sobre el crecimiento anómalo de hueso se comparó con la radioterapia, otra de las herramientas terapéuticas disponibles. Los resultados sugirieron efectos comparables tras 6 semanas de tratamiento con indometacina. No obstante, se observaron efectos adversos sobre la consolidación de la fractura de cadera (208,209).

2. RUPTURA DE LOS EQUILIBRIOS DEL HUESO

Como se ha descrito previamente, el correcto funcionamiento del hueso depende del correcto control de varios equilibrios, siendo el remodelado óseo y el equilibrio osteoblasto-adipocito los más determinantes para la fisiología ósea.

2.1. Alteraciones del equilibrio osteoblástico-adipocítico

La ruptura del balance osteoblasto-adipocito hacia cualquiera de los lados del equilibrio resulta en una situación patológica. Un aumento de la adiposidad ósea se ha relacionado con la pérdida de hueso descrita en numerosas patologías como la osteoporosis, la osteopenia, la obesidad o el envejecimiento, entre otros (13–16).

El papel del tejido adiposo como órgano endocrino se ha estudiado ampliamente en los últimos años y se ha visto cómo puede afectar al remodelado óseo. Es interesante el hecho de que el perfil de expresión génica de los osteoblastos se haya visto modificado en presencia de factores secretados por adipocitos, disminuyendo en esta situación la expresión de genes

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

proosteoblásticos y aumentando la expresión de genes adipogénicos (210). Algunas adipoquinas (hormonas secretadas por el tejido adiposo) ejercen parte de su efecto en el tejido óseo. La leptina producida en la médula ósea y el tejido adiposo (211) afecta al metabolismo y remodelado óseos (212,213). In vivo se ha relacionado de forma diferente la falta de esta hormona con la adiposidad ósea en función de la región del esqueleto (214). La adiponectina es otra de las adipoquinas que pueden afectar al hueso. Sus niveles en plasma se han correlacionado de forma negativa con el IMC (215) así como con un aumento de la osteoblastogénesis, mostrando un efecto contrario en la osteoclastogénesis in vivo (216). No obstante, existe aún controversia respecto a al efecto directo de las adipoquinas en el hueso. No solo las hormonas secretadas por los adipocitos pueden afectar al hueso. Estas células son también productoras de IL6 y TNFα, que como se ha visto previamente crónicamente inclinan el remodelado óseo hacia la resorción (217). Teniendo en cuenta la actividad oxidativa de los adipocitos, cabe destacar que el estrés oxidativo y las especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) pueden alterar el equilibrio osteoblasto-adipocito (218). A lo largo de la vida se produce un aumento de este estrés que se ha relacionado con el aumento de la adiposidad ósea (218).

No obstante, no sólo los adipocitos per se, los propios lípidos y su metabolismo pueden afectar a la osteoblastogénesis. La lipolisis y la consecuente liberación de ácidos grasos libres pueden alterar la expresión de RUNX2 frenando la osteoblastogénesis (219,220) provocando así la pérdida del hueso.

La edad es el factor más determinante para las alteraciones del equilibrio osteoblástico-adipocítico. Se ha descrito en numerosas ocasiones como durante el envejecimiento el equilibrio osteoblasto-adipocito se rompe (221,222). Como consecuencia de esta ruptura aumenta la adiposidad del hueso (223) aumentando de esta forma el riesgo de fractura ósea (13,14). Varios mecanismos se han propuesto como explicación de este proceso. Uno de los sugeridos ha sido la disminución de la expresión de deacetilasas de histonas (Hdac3) con la edad (224).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.1.1. Estudio del equilibrio osteoblástico-adipocítico

Como se ha explicado previamente, la adipogénesis y la osteoblastogénesis son procesos opuestos pero regulados mutuamente (25) actuando los factores proadipogénicos como inhibidores de la osteoblastogénesis y viceversa (18). No obstante, hoy en día no se dispone de un protocolo estandarizado para estudiar in vitro ambos procesos simultáneamente en el mismo contexto celular. La mayoría de los experimentos llevados a cabo para evaluar estas diferenciaciones se realizan en la línea celular de preadipocitos 3T3-L1 (225), o en las líneas preosteoblásticas MC3T3-E1, SaOS2, o MG-63 (226). Aunque estas líneas celulares ofrecen diferenciaciones adecuadas, no mimetizan completamente los procesos desde su origen mesenquimal y no son capaces de diferenciarse a ambos destinos celulares. Este hecho limita el estudio de factores moduladores y nuevas herramientas terapéuticas que actúen sobre la decisión de las MSCs de diferenciarse a osteoblasto o adipocito, o sobre los primeros pasos del proceso de diferenciación. Considerando lo anterior, es necesario un protocolo de diferenciación fiable, así como un modelo de MSCs adecuado, que reduzca la variabilidad debida a las condiciones celulares, ambientales o de cultivo.

2.2. Alteraciones del remodelado óseo

El equilibrio entre la diferenciación osteoblástica y la adipogénica de MSCs no es el único que se puede ver alterado. El remodelado óseo es otro balance susceptible de desregulaciones que puedan provocar situaciones patológicas en el hueso. Algunas de las situaciones que afectan al equilibrio entre diferenciaciones (osteoblástica y adipogénica) también pueden modificar el equilibrio osteoblasto-osteoclasto: los adipocitos presentes en la médula ósea también ejercen efectos paracrinos sobre las células adyacentes, pudiendo afectar al remodelado óseo (227). Se ha descrito que PPARG promueve la osteoclastogénesis a partir de células hematopoiéticas a través de c-fos (228).

De la misma forma, el remodelado óseo también se puede ver afectado por el estrés oxidativo y la liberación de ROS asociada. Se ha relacionado esta situación con un descenso en la cantidad de osteoblastos y, por tanto, menor formación de hueso (229,230). Peng et al. determinaron que el estrés oxidativo

en MSCs aumenta con la edad (231). Aquellas situaciones donde falla la diferenciación osteoblástica de las MSCs pueden causar una ruptura del equilibrio osteoblasto-osteoclasto, que afectará al remodelado óseo y, por ende, provocará una menor calidad del tejido óseo (232).

2.2.1. Osteoporosis

La osteoporosis es la patología ósea más frecuente y se caracteriza por una pérdida de la densidad mineral ósea y de la arquitectura del hueso debido, principalmente, a alteraciones en el remodelado óseo. Está altamente relacionada con la edad y el sexo, siendo más alta en mujeres que en hombres (233,234). La osteoporosis se clasifica en osteoporosis primaria o secundaria y su fase temprana se denomina osteopenia.

- Osteoporosis primaria: es la osteoporosis asociada a la menopausia (Tipo I) o al envejecimiento (tipo II). Esta osteoporosis se debe principalmente a una disminución del nivel de estrógenos. Esta alteración hormonal provoca un aumento de la resorción ósea, aunque también ejerce efectos en la formación de este tejido, inclinando el balance neto hacia la destrucción de hueso (235,236).

  Los estrógenos controlan la expresión de IL1, TNFα e IL6 (237,238), regulación que desaparece en mujeres postmenopáusicas (239). En estas mujeres también se ha observado un aumento de RANKL que correlaciona de forma significativa con el aumento de la resorción ósea (240–242). Igualmente, se sabe que los estrógenos aumentan la expresión de OPG por parte de los osteoblastos (243). Interesantemente, estas hormonas no solo controlan la actividad de los osteoclastos, sino que afectan a su tiempo de vida a través de TGFβ (244).

  La osteoporosis asociada a la edad está relacionada con varios factores que se sabe que se ven alterados durante el envejecimiento. Uno de ellos es el estrés oxidativo y sus efectos sobre la vía WNT (245,246) o la menor biodisponibilidad del Ca (247,248). De la misma forma, se han establecido correlaciones entre la densidad mineral ósea y los niveles séricos de IGF1 (249,250). La disminución de vitamina D observada en

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

los pacientes de edad avanzada resulta en un aumento de PTH mantenido en el tiempo, lo que tiene efectos deletéreos para el hueso (251).

Aunque la prevalencia de la osteoporosis en mujeres es marcadamente mayor que en hombres, en este sexo no es inexistente. Interesantemente, las variaciones en los niveles de andrógenos también se han relacionado con una pérdida de la integridad ósea. No obstante, esta disminución es más gradual que en el caso de los estrógenos en mujeres (252).

- Osteoporosis secundaria: osteoporosis provocada por efectos adversos de determinados fármacos (como lo corticoides) o por otras patologías. Los corticoides alteran la expresión de RANKL/OPG resultando en un aumento de la resorción ósea (253), y, al igual que los estrógenos, alteran la esperanza de vida de los osteoclastos (254). En situaciones de ausencia de carga mecánica también se observa una osteoporosis secundaria (255).

2.2.2. Obesidad

La obesidad y el síndrome metabólico asociado se han relacionado con numerosas patologías musculoesqueléticas (256). Se ha descrito que en la obesidad existe un componente inflamatorio de bajo grado donde se observan niveles aumentados de TNFα en los individuos que la sufren (217). Esta patología también se asocia con cambios en los niveles de las adipoquinas leptina y adiponectina, aumentada la primera (257) y disminuida la segunda (215). No obstante, existe una corriente de pensamiento que sugiere que la obesidad es un factor protector frente a la osteoporosis (258–260). No obstante, esta interpretación errónea se debe que al aumento de carga mecánica que supone el exceso de peso en estos pacientes aumenta la densidad mineral ósea a través de la activación de la vía WNT (261–263). Además, la obesidad durante el desarrollo disminuye el pico de masa ósea correspondiente a esta etapa (264). Asimismo, en humanos y ratones obesos se relacionó el aumento de masa grasa con una peor calidad ósea (214,265–267). La obesidad afecta al remodelado óseo por la alta expresión de citoquinas inflamatorias asociadas y su modulación de la ratio RANKL/OPG (124,147). No solo a nivel del propio osteoclasto, la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

adiposidad ósea observada en esta patología también controla la diferenciación osteoclástica de manera indirecta a partir de células hematopoiéticas (268).

2.2.3. Otras patologías del remodelado óseo

- Enfermedad de Paget: en esta patología existe un remodelado ineficiente e ineficaz que resulta en una gran formación de hueso reticular (1), con zonas escleróticas y/o hipertróficas (269). Se caracteriza por la presencia de osteoclastos hiperreactivos (270). Al igual que las anteriores, su prevalencia aumenta al aumentar la edad de la población (271). Su origen puede ser genético y relacionado con la inflamación, aunque también se ha relacionado con una infección viral crónica (272,273). Después de la osteoporosis es la enfermedad ósea más común.
- Osteopetrosis: esta patología se caracteriza por una resorción ósea no efectiva que resulta en la excesiva formación de hueso. Esta enfermedad tiene un origen genético, y las mutaciones que la ocasionan afectan al borde en cepillo (274), alterando a estructuras como las bombas de protones, los canales de cloro y la catepsina K que son fatores claves en la creación de dicha laguna (1). También se puede originar debido a mutaciones en el receptor LRP-5 o 6 de la vía WNT (275,276).
- Raquitismo: enfermedad provocada por una deficiencia de vitamina D, la osteoblastogénesis no se lleva a cabo de forma correcta y el remodelado óseo se ve aumentado e inclinado hacia la resorción ósea (277).
- Osteogénesis imperfecta: la formación del hueso se ve alterada resultando en un osteopenia y fragilidad ósea (278,279). La práctica totalidad de los casos se deben a mutaciones en los genes de Col IA1 y Col IA2 (279).

2.3. Crecimiento anormal del hueso

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El crecimiento anormal del hueso es una condición patológica que puede ocurrir en diferentes situaciones. En concreto, el hueso anormal se puede

formar en tejidos blandos (osificación heterotópica, OH) o en la superficie del hueso (osteofitos y sindesmofitos).

2.3.1. Osteofitos y sindesmofitos

Los osteofitos son proyecciones óseas que se forman en los márgenes de las articulaciones. Se forman debido a un aumento del área de superficie dañada en la articulación, y son muy comunes en el desarrollo de la artrosis (280).

Los sindesmofitos son crecimientos óseos con origen en el interior de un ligamento, siendo los más comunes los que se encuentran en los ligamentos de la columna vertebral. Son frecuentes en los ligamentos intervertebrales, forzando así la fusión de las vértebras. Se suelen ver en pacientes que han sufrido cirugías de espalda o estrés de forma crónica en los ligamentos de la columna. Es más probable que se desarrollen a partir de lesiones inflamatorias (281,282).

2.3.2. Osificación heterotópica

La OH es el proceso por el cual el tejido óseo se forma fuera del esqueleto, principalmente en tejidos blandos. En otras palabras, la OH es la presencia de hueso en un tejido blando donde no es normal encontrar hueso. Existen varios tipos de OH en función de su origen, pudiendo ser adquirida o congénita.

En la OH traumática el paciente refiere una hinchazón firme, cálida y blanda, así como una disminución del rango de movilidad en la articulación de la zona afectada. En estos casos suele haber un historial de impacto u otros traumatismos previos en el área en las semanas o meses previos. Aquellos pacientes con lesiones neurológicas traumáticas, alteraciones neurológicas severas o grandes quemados frecuentemente también desarrollan OH, experimentando una limitación del movimiento en las regiones afectadas (280,283,284). Esta deslocalización del trauma podría relacionarse con la impresión clínica de que los traumatismos craneoencefálicos aceleran el consolidado óseo (280).

La OH también puede ser provocada por cirugía o traumatismos en las piernas y caderas. Uno de cada tres pacientes con artroplastia total de cadera o

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

con una fractura severa de hueso largo en las extremidades inferiores desarrollará OH (285). No obstante, estas osificaciones suelen ser asintomáticas. Entre un 50% y un 90% de los pacientes que desarrollan OH tras una artroplastia de cadera desarrollarán más osificaciones a lo largo de su vida (286).

La OH también puede tener un origen genético. Una de sus manifestaciones clínicas es la FOP (191). Esta condición provoca que tejidos con heridas sean reemplazados con hueso heterotópico (191). Es característica su expresión en el pulgar del pie en neonatos (287), y provoca la formación de hueso heterotópico por todo el cuerpo durante la vida del paciente, causando dolor crónico y, eventualmente, la fusión e inmovilización del esqueleto (191). Otra enfermedad rara que cursa con OH es la heteroplasia ósea progresiva (HOP), caracterizada por la presencia de osificaciones cutáneas o subcutáneas (288).

Respecto al tratamiento, actualmente no hay una forma clara de abordar esta patología. Originalmente se consideraron los bisfosfonatos por su capacidad de afectar al remodelado óseo, pero no existe evidencia suficiente que apoyara su uso, aunque se han seguido empleando como medida profiláctica tras cirugías de cadera (289). En función de la localización, orientación y severidad del crecimiento óseo, se pueden plantear exéresis quirúrgicas, pero pueden llevar asociadas recidivas de la enfermedad (191). La radioterapia es otra de las herramientas terapéuticas más empleadas (290), usándose como medida profiláctica desde los años 70, y demostrando su eficacia en situaciones concretas. Se suele tratar la zona articular empleada y sirve para rodilla (291), cadera (292,293), codo (294), mandíbula (295) o pacientes que han sufrido traumatismos en la columna vertebral (293). El beneficio-riesgo de una dosis única de radioterapia se ha aceptado, no obstante, no es un tratamiento válido para población pediátrica (296). Es más, aunque la radioterapia ofrece una mejora en las ratios de recurrencia y aparición de OH, se considera un tratamiento agresivo y no específico.

Otros tratamientos que se han considerado han sido ciertos AINEs como la indometacina (208,209) o el ibuprofeno (289). Estos principios activos han demostrado cierto efecto a la hora de prevenir las recurrencias de OH tras un reemplazo total de cadera (208,209,289). Tratamientos conservadores como

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ejercicios pasivos de rango de movimiento u otras técnicas de movilización por parte de fisioterapeutas, terapeutas ocupacionales o médicos rehabilitadores también se han tenido en cuenta para la prevención de la OH (297).

Consecuentemente, se puede decir que las herramientas terapéuticas y estrategias disponibles actualmente para la prevención de la OH solo demuestran resultados parciales y, las que demuestran mejores efectos, son altamente agresivas para aquellos pacientes que se pueden beneficiar de ellas. Por ello, encontrar un tratamiento efectivo y no agresivo para la prevención de la formación de hueso heterotópico es una necesidad médica.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

REGULACIÓN DE LA OSTEOBLASTOGÉNESIS A TRAVÉS DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

1. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

Los factores de transcripción (FTx) son proteínas que controlan la transcripción de ADN a ARN. Se unen a secuencias cortas de ADN en los promotores de los genes para controlar su expresión induciendo o inhibiendo la actividad de la ARN polimerasa II. Ellos mismos o formando complejos dirigen a esta proteína a genes concretos.

Como se ha descrito previamente, existen numerosas vías de señalización celular que controlan el proceso de diferenciación osteoblástica (vía WNT, vía de las BMPs, vía hedgehog, …). Este control no es independiente, sino que estas vías trabajan en red integrando las señales y estímulos que reciben a través de una serie de FTx que son los que realmente controlarán los procesos de diferenciación de las MSCs. En el caso de la osteoblastogénesis uno de los FTx más conocidos es RUNX2, que controla, entre otros, la expresión del gen TGFβ1 (298). Uno de los FTx principales en la adipogénesis es PPARG (16). La influencia de los FTx en este último proceso ha sido estudiada más profundamente que la regulación de la diferenciación osteoblastogénica, para la cual aún no se conoce la intrincada red de FTx que la regulan.

Los factores de transcripción no son el único mecanismo que controla la expresión génica. Las modificaciones epigenéticas también lo hacen (299). La metilación del ADN consiste en la unión covalente de un grupo metilo en la posición 5' de una citosina en un dinucleótido (CpG) del ADN (300). Este mecanismo tiene como fin el silenciamiento génico (301) por la capacidad de bloquear físicamente la unión de los FTx al ADN (302). Interesantemente, las regiones del ADN más ricas en CpGs no se distribuyen de manera homogénea en el ADN, sino que abundan en regiones de regulación, incluidas aquellas a donde se unen los FTx (302). De esta forma, la metilación relaciona la expresión génica con la actividad de los factores de transcripción, haciendo que el estudio de las regiones de unión del ADN y de su estado de metilación resulte en el

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

desarrollo del conocimiento sobre los FTx claves asociados a la diferenciación osteoblastogénica de MSCs.

La modulación de los FTx podría tener implicaciones en clínica puesto que se sabe que una activación farmacológica crónica del receptor/FTx PPARG aumenta el número de fracturas en pacientes diabéticos (303). De hecho, el estudio de los cambios epigenéticos como reguladores del balance osteoblasto-adipocito ha sido puesto en relevancia en los últimos años (304,305). En concreto, se ha relacionado la metilación del ADN con este proceso, ya que es sabido que agentes desmetilantes lo pueden modular (306).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

OBJETIVOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

- Establecer un nuevo y mejorado protocolo de diferenciación de MSCs para el estudio del equilibrio entre osteoblastogénesis y adipogénesis.
- Estudiar el papel de los factores de transcripción más relevantes asociados a los cambios de metilación del ADN durante la osteoblastogénesis en los procesos de diferenciación osteoblástica y adipocítica.
- Estudiar la expresión y/o la actividad de los factores de transcripción implicados en la osteoblastogénesis o en la adipogénesis en las alteraciones óseas asociadas a las patologías musculoesqueléticas con más prevalencia.
- Evaluar el impacto de los factores moduladores del balance osteoblasto-adipocito en la expresión y/o actividad de los factores de transcripción implicados en la osteoblastogénesis o en la adipogénesis.
- Identificar una nueva terapia para prevenir y tratar el crecimiento anormal del hueso.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

MATERIAL Y MÉTODOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

MATERIAL Y MÉTODOS

1. CULTIVOS CELULARES

1.1. Línea celular C3H10T1/2

La línea C3H10T1/2 es una línea mesenquimal obtenida a partir del clon 8 de células embrionarias del ratón C3H en 1973 (307). Dado su origen de célula madre mesenquimal presenta características fibroblásticas. En presencia de los factores correctos es capaz de diferenciarse a adipocito (19), a condrocito (308) y a osteoblasto (308). Aunque el modelo celular ideal sean las células madre mesenquimales humanas de origen primario, éstas son escasas y difíciles de conseguir. Se ha demostrado la comparabilidad entre la diferenciación a los tres destinos celulares de las C3H10T1/2 con la de células madre mesenquimales humanas de origen primario (308).

El cultivo celular de esta línea se ha mantenido con medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM por sus siglas en inglés) con alta concentración de glucosa (4.5mg/ml), suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, antibiótico al 1% (penicilina/estreptomicina), y glutamina 4mM. Para mantener las células en cultivo se realizaron pases celulares cada 2-3 días, una vez las células alcanzaron el 80% de confluencia. Tras la retirada del medio presente se procedió al lavado con tampón fosfato salino 1x (PBS: NaCl 0,137M, KCl 2,7mM, Na_2HPO_4 1,44g/L, KH_2PO_4 0,24g/L) y al despegue de las células con 2ml de Tripsina/0,5% EDTA por placa de cultivo de 100mm. Tras 7 minutos a 37ºC, se añadieron 7ml de medio de cultivo y se sembraron a una densidad de $5x10^6$ por placa de cultivo.

1.2. Línea celular hMSC-TERT

La línea celular humana hMSC-TERT de células madre mesenquimales de médula ósea fue donada por el Dr. Campana (Universidad Nacional de Singapur). Esta línea se obtuvo a partir de la inmortalización, de células madre mesenquimales de un hombre de 33 años. Dicha inmortalización se realizó mediante la sobreexpresión de la transcriptasa reversa de la telomerasa humana (TERT, por sus siglas en inglés). Al igual que la línea C3H10T1/2, estas células

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

poseen la capacidad de diferenciarse tanto a osteoblasto (309) como a adipocito (310). Interesantemente, su potencial de diferenciación es comparable al de células mesenquimales humanas de origen primario (311).

El medio de cultivo de esta línea celular consiste en DMEM:Hams F12, 10% de FBS con las proteínas del complemento inactivadas (incubación a 56ºC durante 1 hora), antibiótico al 2% (penicilina/estreptomicina) y glutamina 4mM. Para mantener las células en cultivo se realizaron pases en el momento en que los cultivos alcanzaron el 80% de confluencia, cada 2-3 días aproximadamente. Tras un lavado con 3ml de PBS 1x, se añadieron 4ml de tripsina/0,5%EDTA al matraz de cultivo de 75cm^2 en el que se cultivaron las células, y se mantuvieron durante 5 minutos a 37ºC. Pasado este tiempo, se inactivó la tripsina con 9ml de medio, se centrifugaron las células a 1400rpm durante 6 minutos, y se sembraron en un nuevo matraz de cultivo a una densidad de 10^6 células por ml.

1.3. Línea celular SaOS2

La línea celular SaOS2 fue generada a partir de células de osteosarcoma de una mujer de 11 años en 1977 (312). Estas células tienen características osteoblásticas (313) y han sido descritas como una de las líneas celulares más semejante a osteoblastos primarios (314).

El medio de cultivo para estas células consiste en DMEM:Hams F12, 5% FBS, 10% de antibiótico (penicilina/estreptomicina) y glutamina 2mM. Para mantener la línea SaOS2 en cultivo, se realizaron pases de igual manera que los descritos previamente para las células hMSC-TERT.

1.4. Línea celular ATDC5

La línea de ratón ATDC5 es una línea embrionaria de cartílago aislada en 1990 a partir de un cultivo de teratocarcinoma con características fenotípicas fibroblásticas durante su fase de crecimiento (315). En presencia de insulina 10μg/ml esta línea puede mantener su crecimiento más allá de la confluencia formando agregados semejantes a los nódulos formados por los condrocitos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tiñendo estas células con azul alcián se comprobó la síntesis de proteoglicano y colágeno II, marcadores específicos de diferenciación condrogénica (315).

Las características intrínsecas de la línea ATDC5 permiten estudiar los procesos fisiológicos del cartílago y de la placa de crecimiento puesto que nos permite trabajar en tres estados distintos de diferenciación: condrogénico, condrocito maduro y condrocito hipertrófico. De esta forma, se puede considerar como una línea celular óptima para mimetizar las primeras fases de la osificación endocondral.

El mantenimiento celular de estas células requiere de medio DMEM:Hams F12 suplementado con el 5% de FBS, 2% de antibiótico (penicilina/estreptomicina), 5µg/ml de apo-transferrina y 30nM de selenito sódico.

1.5. Células madre mesenquimales de médula ósea humanas

Las células madre mesenquimales de médula ósea humanas (hMSC) son células pluripotentes con la capacidad de diferenciarse a diversos destinos celulares como condrocito, osteoblasto o adipocito. El uso de este tipo celular permite estudiar el balance entre osteoblastogénesis y adipogénesis en el contexto del hueso, así como su posible modulación.

Las hMSC fueron adquiridas a Thermo Fisher Scientific (MA, USA) y su mantenimiento y manejo se realizaron acordes a las instrucciones del proveedor. El medio MesenPro RS Medium suplementado con MesenPRO RS Growth Supplement fue el empleado para el mantenimiento de estas células en cultivo. Los pases se realizaron de igual manera que en el caso de la línea hMSC-TERT, y no se utilizaron células con más de 5 pases para evitar la pérdida del fenotipo y de su capacidad de diferenciación.

1.6. Aislamiento y cultivo primario de osteoblastos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Los osteoblastos primarios humanos se obtuvieron de cirugías de reemplazo articular o de exéresis de placas óseas procedentes de osificaciones ectópicas. El Comité Ético de Investigación del Área de Santiago y Lugo aprobó este procedimiento en el protocolo CAEIG-2016/258. Todos los pacientes

firmaron un consentimiento informado acerca del tratamiento de las muestras y del fin de la investigación, de acuerdo con la declaración de Helsinki. Todos los procesos se realizaron como se describe en las guías y regulaciones vigentes. Se accedió al historial clínico de los pacientes para identificar comorbilidades, tratamientos farmacológicos vigentes y otras situaciones fisiopatológicas que pudiesen afectar al metabolismo óseo. Todas las muestras fueron correctamente anonimizadas.

Una vez realizada la cirugía, y en condiciones de esterilidad, se extrajo el hueso identificando y separando según la zona de la que provenía, el tipo de hueso (cortical o trabecular), su patología, u otras condiciones que pudiesen afectar al proceso normal de osteoblastogénesis. Una vez clasificado el hueso, se lavó con PBS 1x un mínimo de 5 veces hasta eliminar completamente restos grasos o hemáticos que pudiesen interferir con los resultados esperados. Seguidamente, se congeló a -80ºC una parte de cada una de las muestras para la posterior extracción de su ARN. La muestra restante, previamente fragmentada se colocó en una placa de cultivo de 100mm de forma que los fragmentos de hueso estuviesen separados y con la máxima superficie posible en contacto con la base de la placa. Una vez dispuestos, se añadieron 7ml de medio de cultivo (DMEM:Hams F12, 10% FBS, penicilina/estreptomicina al 2% y glutamina 4mM) gota a gota sobre cada uno de los fragmentos. Transcurridos 10 días del procesado de hueso, se procedió a realizar cambios de medio cada 2 días según el mismo procedimiento. Una vez alcanzada una confluencia del 70%, los fragmentos de hueso se transfirieron a una nueva placa para repetir el protocolo hasta 3 veces más. Las células obtenidas de los explantes óseos se pasaron tras alcanzar el 85% de confluencia, una vez retirado el medio de cultivo y realizado un lavado con PBS 1x, se emplearon 3ml de tripsina/0,5% EDTA durante 7 minutos para despegar las células. Transcurrido este tiempo, se bloqueó la tripsina con 7ml de medio fresco, y se dividió la suspensión celular en 3 nuevas placas, añadiendo el medio necesario para un volumen final de 7ml por placa. Los osteoblastos primarios de hueso no se utilizaron nunca más allá del quinto pase para evitar la pérdida de fenotipo o de la capacidad de diferenciación osteoblástica.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2. DIFERENCIACIÓN CELULAR

La diferenciación celular es el proceso por el cual una célula madre mesenquimal se transforma en un nuevo tipo celular especializado. En esta tesis se han realizado diferenciaciones a dos estirpes celulares: osteoblasto y adipocito. Para conseguir una diferenciación completa es necesario completar 21 días de experimento, realizando a los días 0, 7, 14 y 21 puntos de control del proceso. A lo largo de estos 21 días se realizan cambios de medio de diferenciación cada 2-3 días con el fin de aportar a las células los nutrientes y factores de diferenciación necesarios para el proceso. En el caso de la diferenciación osteoblástica el medio utilizado fue siempre el mismo. Sin embargo, en la diferenciación adipogénica fue necesario realizar ciclos de 4 días de medio de inducción y 3 días de medio de mantenimiento. Existen pequeñas diferencias en la confluencia necesaria para iniciar la diferenciación según el tipo celular, así como en los medios utilizados, que se pasan a detallar en la Tabla 1. En todo momento la concentración de los vehículos empleados para solubilizar los diferentes factores se mantuvo por debajo del 0,1% para evitar efectos tóxicos.

Tipo celular	Estirpe	Nº de células	Pocillo	Tiempo entre siembra e inicio diferenciación	Composición medio
C3H10T1/2	AD	10000	p24	6 horas	Medio de inducción: DMEM high glucose Rosiglitazona 2µM Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF1) 20nM Dexametasona 1 µM Indometacina 60µM Isobutilmetilxantina (IBMX) 0,5mM Insulina 10µg/ml Glutamina 4mM Antibiótico 1% FBS 10% Medio de mantenimiento: DMEM high glucose Insulina 10µg/ml

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

hMSC-TERT		5000	p24	72 horas	Glutamina 4mM Antibiótico 1% FBS 10%
hMSC		45000	p24	24 horas	StemPro Adipogenesis Differentiation Kit
C3H10T1/2	OB	10000	p24	6 horas	DMEM high glucose Dexametasona 10nM β-Glicerol Fosfato 5mM Ácido ascórbico-2-fosfato 50µg/ml Glutamina 4mM Antibiótico 1% FBS 10%
hMSC-TERT		300000	p6	24 horas	
hOB		45000	p24	24 horas	
OHhOB		45000	p24	6 horas	
SaOS2		130000	p6	10 días	DMEM high glucose AA2P 50µg/ml Glutamina 4mM Antibiótico 2% FBS 10%
hMSC		45000	p24	24 horas	StemPro Osteogenesis Differentiation Kit

Tabla 3. Diferenciación celular a adipocito y osteoblasto. Condiciones de siembra y composición de los medios de diferenciación.

3. TRATAMIENTOS

Los tratamientos empleados a lo largo de los experimentos descritos se añadieron al medio de cultivo de cada uno de los pocillos para obtener la concentración final descrita en la Tabla 2. En todo momento la concentración de los vehículos empleados para solubilizar los diferentes factores se mantuvo por debajo del 0,1% para evitar efectos tóxicos.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tratamiento	Concentración	Tratamiento	Concentración
Rosiglitazona	2µM	IGF1	20nM
Pioglitazona	10µM	BIO	1µM
Dexametasona	1µM	LiCl	20mM
Indometacina	60µM	siRNA	15nM

Tabla 4. Tratamientos celulares y concentraciones

4. SILENCIAMIENTO DE GENES

Para realizar el silenciamiento de genes se utilizó la técnica de transfección con ARN pequeños interferentes (siRNA por sus siglas en inglés). En ella, un pequeño fragmento de 20-25 nucleótidos de ARN interfiere con el ARN mensajero (ARNm) del gen diana, impidiendo así su expresión. Para ello, se sembraron C3H10T1/2 con el mismo protocolo que para realizar la diferenciación, y transcurridas 24 horas se procedió al silenciamiento mediante transfección con el siRNA pertinente. El paso previo consistió en el lavado de las células con medio libre de suero (OptiMEM ®) indicado para mejorar la eficacia de la transfección, y con DMEM:Hams F12 con un 2% de FBS. Tras los lavados, se mantuvieron las células con 500µL de DMEM:Hams F12 con FBS al 2% durante 1 hora aproximadamente. Los reactivos utilizados para el silenciamiento fueron 3 oligonucleótidos de ARN para cada uno de los genes de interés, que se incubaron con un reactivo de transfección (SilentFect ®) y con OptiMEM durante 20 minutos a temperatura ambiente. Transcurridos los tiempos de incubación, se añadieron a cada uno de los pocillos con células 250µL de DMEM:Hams F12 con un 2% de FBS, y 50µL del cóctel de oligonucleótidos y SilentFect ®, silenciando de esta forma un gen en cada uno de los pocillos. 6 horas después de la transfección, se cambió el medio presente por el medio de diferenciación correspondiente y se continuó con el proceso de diferenciación como se ha descrito previamente, durante 7 días.

5. TÉCNICAS COLORIMÉTRICAS

5.1. Rojo de alizarina

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Esta tinción se empleó para evidenciar depósitos cálcicos en la matriz extracelular. Previamente a la tinción fue necesario fijar las células con EtOH frío, al 70%, durante 5 minutos a -20ºC. Tras su secado, las células se incubaron

durante 25 minutos con rojo de alizarina 40mM, pH4.2, y se lavaron posteriormente con agua destilada. Las fotografías se tomaron una vez las células estuvieron secas.

5.2. Rojo de aceite O

El rojo de aceite O es un colorante lipofílico que tiñe grasas neutras o gránulos de polietileno permitiendo así evidenciar depósitos de grasa intracelular. Para realizar esta tinción, las células se fijaron con formol 4% a temperatura ambiente durante 1h. Una vez secas, se incubaron las células con rojo de aceite O 21% (p/p) durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se realizaron 4 lavados con agua destilada para eliminar restos de colorante. Para realizar las fotografías se añadieron 500µL de agua destilada a cada pocillo, y se tomaron las fotografías al microscopio.

6. EXTRACCIÓN DE ARN

Para la extracción de ARN celular de cultivos o de muestras de hueso se utilizaron los reactivos TriReagent ® y el kit de extracción E.Z.N.A. Total RNA Kit I ®.

En los experimentos de diferenciación la siembra de células y el tiempo de tratamiento se llevó a cabo de acuerdo con lo descrito en la Tabla 1. Para el resto de los experimentos las células se sembraron a densidad $3x10^4$ células/cm^2.Una vez pegadas de forma estable se realizó una privación de suero durante 18 horas, seguidamente se trataron las células con los agentes y tiempos definidos para cada experimento.

Una vez finalizados los experimentos, se retiró el medio de cultivo y se añadieron 500 y 750µL de TriReagent ® directamente sobre los pocillos de placas p24 y p6 respectivamente. El lisado celular se pipeteó varias veces arriba y abajo para garantizar la acción del reactivo. Este lisado se transfirió a tubos de microcentrífuga de 2ml y tras una incubación a temperatura ambiente durante 5-10 minutos se añadieron 100µL de cloroformo por cada 500µL de TriReagent ®. Los tubos se agitaron intensamente 5 segundos y se incubaron de nuevo 5 minutos a temperatura ambiente. Acto seguido, se centrifugaron a 12000xg, 4ºC

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

durante 15 minutos. Terminada esta centrifugación, se recogió la fase superior (acuosa) de cada uno de los tubos y se transfirió a un nuevo tubo de microcentrífuga. A partir de este punto se siguieron las instrucciones del fabricante del kit E.Z.N.A. Total RNA Kit I ®. El siguiente paso fue realizar una mezcla homogénea 1:1 de la fase acuosa con EtOH 70%, que se transfirió a las mini columnas del kit. Éstas se centrifugaron a 10000xg durante 1 minuto y se descartó el eluido. El ARN se quedó retenido en la membrana de la columna. Tras este paso, se repitieron las centrifugaciones lavando las membranas con los reactivos RNA Wash Buffer I y RNA Wash Buffer II (2 veces) respectivamente. Una vez realizados todos los lavados se secó la membrana centrifugando a 12000xg durante 2 minutos. Llegados a este punto, la columna se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1,5ml donde el ARN se eluyó con 35µL de agua libre de ARNasas y una centrifugación de 12000xg, durante 2 minutos.

Tras la obtención del ARN se determinó su concentración y pureza analizando 1,5µL del eluido en el espectofotómetro Nanodrop ®. Para considerar óptimo un valor de concentración de ARN sus ratios de absorbancia 260/280nm y 260/230nm debían ser mayores de 2 y de 1,7 respectivamente.

7. RT-PCR

Una vez extraído y determinada la calidad del ARN solo se realizó la reacción de retrotranscripción (RT) a aquellos ARNs que satisfacían los criterios arriba expuestos.

7.1. RT

Previo paso a la RT se digirió el ARN extraído con ADNasa con el fin de eliminar impurezas de ADN genómico. Para ello, se tomó una misma cantidad de ARN para las muestras de cada experimento y condición y se incubaron con una mezcla de ADNasa, tampón y agua durante 30 minutos a 37ºC.

A partir de 2µL de la digestión se realizó la RT según las instrucciones del proveedor. Por cada condición estudiada se añadió una mezcla de 8µL de reactivos proveídos por el kit, y se realizó la RT durante 30 minutos a 37ºC, y 5

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

minutos a 95ºC para inactivar la enzima retrotranscriptasa y degradar el ARN. El ADNc obtenido en este proceso se conservó a -20ºC para mayor estabilidad de las moléculas.

7.2. PCR

El protocolo seguido para realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) fue el indicado por el proveedor. Todas las reacciones de PCR (gen de interés, gen normalizador y control negativo) se efectuaron en un volumen de 10µL, y por duplicado. Del volumen total de reacción, 1µL era ADNc, y los 9µL restantes eran cóctel de reacción, consistente en 5µL de mezcla maestra, 0,9µL de la mezcla de cebadores, y 3,1µL de agua libre de RNAsas y DNAsas.

Los pares de cebadores empleados, adquiridos a Sigma-Aldrich, fueron los siguientes (Tablas 5 y 6):

Descripción	Símbolo	Secuencia (5'-3') cebador delantero	Secuencia (5'-3') cebador inverso
Adiponectina	ADIPOQ	GGTCTTATTGGTCCTAAGGG	GTAGAAGATCTTGGTAAAGCG
Fosfatasa alcalina	ALPL	TCTTCACATTTGGTGGATAC	ATGGAGACATTCTCTCGTTC
Factor de transcripción dependiente de AMP cíclico	ATF3	AGAAAGAGTCGGAGAAGC	TGAAGGTTGAGCATGTATATC
Proteína morfogénica del hueso, 2	BMP2	TCCACCATGAAGAATCTTTG	TAATTCGGTGATGGAAACTG
Proteína α de unión a CCAAT/promotor	CEBPA	AGCCTTGTTTGTACTGTATG	AAAATGGTGGTTTAGCAGAG
Proteína β de unión a CCAAT/promotor	CEBPB	ATAAACTCTCTGCTTCTCCC	CCGTAGGAACATCTTTAAGC
Proteína 2 de unión C-terminal	CTBP2	ACATACAGATATCCGCCAG	TTGTGAGTCACTGGGATG
Potenciador del homólogo zeste 2	EZH2	AAGAAATCTGAGAAGGGACC	CTCTTTACTTCATCAGCTCG
Proteína ligante a ácidos grasos	FABP4	CAAGAGCACCATAACCTTAG	CTCGTTTTCTCTTTATGGTGG
Proteína c-FOS	FOS	CAGTTATCTCCAGAAGAAGAAG	CTTCTAGTTGGTCTGTCTCC
Antígeno 1 relacionado con FOS	FOSL1	CTTGTGAACAGATCAGCC	CCAGATTTCTCATCTTCCAG

Antígeno 2 relacionado con FOS	FOSL2	AAGAAAAACACCCTGTTTCC	TATCTACCCGGAATTTCTGC
Osteoactivinia	GPNMB	CAGATCAGATTCCTGTGTTTG	ACAGTATGATTGGTGGAAAC
Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa	HPRT	ATAAGCCAGACTTTGTTGG	ATAGGACTCCAGATGTTTCC
Factor de transcripción de choque térmico 1	HSF1	AACAGAAAGTCGTCAACAAG	CTATACTTGGGCATGGAATG
Factor 3 regulador del interferón	IRF3	ATTCTGGATGAGTTACTGGG	AAGGTAATCAGATCTTCCCC
Factor de transcripción Jun	JUN	AAAGGATAGTGCGATGTTTC	TAAAATCTGCCACCAATTCC
Factor de transcripción Jun-b	JUNB	TACTGTGGAAAAGAAACACG	GAACAAACACACACAAACAC
Subunidad α del factor de transcripción nuclear Y	NFYA	CAAGTTACAGTCCCTGTTTC	CTCCTGAATTGACCACATTG
Receptor de glucocorticoides	NR3C1	ACTGCTTCTCTCTTCAGTTC	GATTTTCAACCACTTCATGC
Factor de respiración nuclear 1	NRF1	CCACACATAGTATAGCTCATC	TACCAACCTGGATAAGTGAG
Homeobox 3 PBX	PBX3	CAGGTATCCAATTGGTTTGG	GAATTGGTCTGGTTGTTCTG
Perilipina 2	PLIN2	GTTCACCTGATTGAATTTGC	GAGGTAGAGCTTATCCTGAG
Receptor de proliferador de peroxisoma activado γ	PPARG	AAAGAAGCCAACACTAAACC	TGGTCATTTCGTTAAAGGC
Factor regulador X5	RFX5	GATCTTCCCTGACATCAAAG	GGACTCTCAGAACCCTTTAG
Factor de transcripción relacionado con RUNT, 2	RUNX2	AAGCTTGATGACTCTAAACC	TCTGTAATCTGACTCTGTCC
Proteína de 30kDa asociada a SIN3A	SAP30	ACCCCAGAGGTTGATTTATAC	GTGCTTTATTAAGTCCTGGTC
Histona-lisina N-metiltransferasa SETDB1	SETDB1	AAAACAAGCTCAGGTTTCTC	GAGATGTCTTCTATGTCCTCC
Miembro A de la familia de factores de transcripción SIN	SIN3A	CAGAAAGAGCAGAGAAATGC	GTAGGAATTGTCCAAACTCTG
Activador de transcripción BRG1	SMARCA4	GATGTCGATGATGAATATGGC	ATCTGGTACTGTTTGAGGAC
Subunidad SMARCC1 del complejo SWI/SNF	SMARCC1	AAAGATCAAGTCCCTGGTAG	TAGAGCTTCTTTCTCTCTGTC
Factor de transcripción SP4	SP4	TCATTTACGAGCACATCTTC	TTCACCTGTATGGGTTCTTC

Osteopontina	SPP1	GACCAAGGAAAACTCACTAC	CTGTTTAACTGGTATGGCAC
Transductor de señal y activador de la transcripción 3	STAT3	GGTACATCATGGGCTTTATC	TTTGCTGCTTTCACTGAATC
Subunidad SUZ12 del complejo de represión del polycomb	SUZ12	GGATGTAAGTTGTCCAATAAGG	GTTTGATTGAGGTCAGGATTC
Factor de transcripción 7 semejante a 2	TCF7L2	AAGAGCAAGCGAAATACTAC	CTTCTTTCCATAGTTATCCCG
Proteína 1 que contiene el dominio THAP	THAP1	AAGTTTCCTCTTACTCGACC	CAAATACTGCTATACTTGGTGG
Homeobox 1 de unión al E-boxing	ZEB1	AAAGATGATGAATGCGAGTC	TCCATTTTCATCATGACCAC
Dedo de Zn 143	ZNF143	TGCTAAATCTCAACAGAGTG	ATGGACCTTGAGATGATGAG

Tabla 5. Referencia de los cebadores de humano usados para PCR en tiempo real

Descripción	Símbolo	Secuencia (5'-3') cebador delantero	Secuencia (5'-3') cebador inverso
Adiponectina	ADIPOQ	CCACTTTCTCCTCATTTCTG	CTAGCTCTTCAGTTGTAGTAAC
Fosfatasa alcalina	ALPL	ATTCCCACTATGTCTGGAAC	CTCAAAGAGACCTAAGAGGTAG
Proteína ligante a ácidos grasos	FABP4	GTAAATGGGGATTTGGTCAC	TATGATGCTCTTCACCTTCC
Osteoactivinia	GPNMB	CTCTTTAATGCCTACTGGTTAC	GCCATATCTGTTTATTCGGC
Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa	HPRT	AGGGATTTGAATCACGTTTG	TTTACTGGCAACATCAACAG
Factor de respiración nuclear 1	NRF1	AAACAAAGGGTTTCATGGAC	GGTACGAGATGAGCTATACTG
Perilipina 2	PLIN2	ATAAGCTCTATGTCTCGTGG	GCCTGATCTTGAATGTTCTG
Receptor de proliferador de peroxisoma activado γ	PPARG	AAAGACAACGGACAAATCAC	GGGATATTTTTGGCATACTCTG
Factor de transcripción relacionado con RUNT, 2	RUNX2	ACAAGGACAGAGTCAGATTAC	CAGTGTCATCATCTGAAATACG
Proteína de 30kDa asociada a SIN3A	SAP30	TTGTTGAGATAGTTGGTTGC	TAGTGTGAACAGCATCTCTC
Histona-lisina N-metiltransferasa SETDB1	SETDB1	CTTGGGAGGACATAGAAGATAG	TTTTGTCATCCAGAAAGAGG
Factor de transcripción SP4	SP4	AAGAAGAAGCAGCATGTTTG	AATCTCTTTTCACCTGTGTG

Osteopontina	SPP1	GGATGAATCTGACGAATCTC	GCATCAGGATACTGTTCATC
Subunidad SUZ12 del complejo de represión del polycomb	SUZ12	ATATGGTGAAGTCCTACTCG	GGAAGTTCTTCACTGACATC
Homeobox 1 de unión al E-boxing	ZEB1	ATATGAGCACACAGGTAAGAG	TTCATGTGTTGAGAGTAGGAG

Tabla 6. Referencia de los cebadores de ratón usados para PCR en tiempo real

El programa de PCR fue común para todas las PCRs independientemente del tipo de cebador usado. El perfil térmico fue el siguiente: 1 minuto a 95ºC, 45 ciclos de 15 segundos a 95ºC, 30 segundos a 60ºC, 1 minuto a 95ºC, 30 segundos a 55ºC, 30 segundos a 95ºC de nuevo.

7.2.1. Cuantificación relativa

El equipo de PCR a tiempo real QuantStudio 3® fue el utilizado para realizar las amplificaciones y cuantificaciones relativas. El papel de calibrador se le asignó al ADNc de la muestra control, para el cual se asignó el valor de 1. Todos los resultados obtenidos en las diferentes muestras se refirieron a este valor, determinando así que la cuantificación fuese relativa al valor del calibrador.

Cada ADNc se amplificó dos veces, una con los cebadores del gen de interés y otra con los cebadores del gen normalizador. Este gen (HPRT) no varía su expresión como consecuencia de los tratamientos o procesos de diferenciación, lo que permite su uso como control de carga.

Para realizar la cuantificación relativa el programa utiliza el método ΔΔCt. Ct se refiere al ciclo a partir del cual la amplificación empieza a ser estadísticamente significativa respecto al ruido de fondo. Considerando que la relación entre Ct y la concentración de ADNc es inversamente proporcional, y que en cada uno de los 45 ciclos de la PCR se duplican las copias, el nivel de expresión de cada gen (L) se puede representar como:

$$= 2$$

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Como para cada gen el nivel de carga entre las muestras puede sufrir pequeñas variaciones, éstas se minimizan indicando la expresión de cada gen

respecto a la expresión de un gen normalizador. Su representación sería la siguiente:

$$\frac{2^{(\quad)}}{2^{(\quad)}} = 2^{[\quad(\quad)\quad(\quad)]} = 2$$

Tras la normalización de la expresión del gen de interés se procede a la cuantificación relativa de cada una de las muestras respecto al calibrador. Con esta operación se determina la variación de expresión del gen de interés en una muestra respecto al control. Esta cuantificación relativa se calcula dividiendo la expresión normalizada del gen de interés en la muestra problema entre la expresión del gen de interés en el control (calibrador). Su representación es la siguiente:

$$\frac{2^{(\quad)}}{2^{(\quad)}} = 2^{(\qquad)-(\qquad)}$$

7.2.2. Controles de calidad

En todas las reacciones de PCR llevadas a cabo se realizó un control negativo de calidad en el cual no se incluyó ADNc. Esto permite discernir si el resultado obtenido se debe a la hibridación de los cebadores con el ADNc problema, o a la formación de dímeros entre ellos. Esta última situación daría lugar a un falso positivo. De igual forma, se realizó un control de especificidad ulterior con la realización de una curva de disociación. Esta curva permite determinar la temperatura de fusión específica para el fragmento amplificado en cada gen y para cada par de cebadores, confirmando así la ausencia de dímeros de cebadores que puedan resultar en un falso positivo.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Todos los resultados obtenidos en este trabajo se han expresado como la media ± la desviación estándar de la media (SEM) de, como mínimo, tres experimentos o muestras independientes. Los resultados estadísticos fueron analizados con dos programas de análisis estadístico: GraphPad Software Inc.

y R. En ambos se empleó un análisis de Student paramétrico o no-paramétrico según correspondiese al tipo de muestra. Un valor de p menor de 0,05 ($p<0,05$) se consideró significativo. En la representación gráfica de los resultados $p<0,05$ se indicó como *, $p<0,01$ como **, $p<0,001$ como ***, y $p<0,0001$ como ****. El mismo criterio se siguió para los símbolos # y $. Para las correlaciones, se emplearon los análisis de Spearman y Pearson según el requerimiento de cada muestra.

9. REVISIÓN DE LITERATURA

Con el fin de determinar un protocolo consenso para el medio adipogénico, se realizó la búsqueda del término "adipogenesis protocol" en la base de datos PubMed. Tras la selección de una muestra representativa de artículos (el 10% de los artículos ordenados por "mejor opción"), se estableció un medio de diferenciación adipogénica consenso (Medio consenso). Adicionalmente, buscando confirmar la adición de IGF1 al medio de diferenciación adipogénico, se realizó la búsqueda del término "adipogenesis IGF1" en la base de datos de PubMed. Se estudiaron todos los resultados obtenidos sin limitación de fechas. Todos los protocolos analizados en ambas búsquedas bibliográficas se tuvieron en cuenta para elaborar un medio adipogénico consenso.

Buscando establecer un medio osteoblastogénico consenso, se buscó el término "osteoblastogenesis protocol" en la base de daros de PubMed. Todos los resultados obtenidos fueron analizados para concretar los reactivos óptimos para el medio osteoblastogénico consenso.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

10. LISTA DE REACTIVOS

- Ácido ascórbico-2-fosfato – Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
- ACTRAPID 100 UI/ML
- Agua ultrapura libre de ARNasas y ADNasas – Thermo Fisher Scientific, Wlatham, MA, USA
- Apo-transferrina – Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
- ATDC5 línea celular condrogénica de ratón – Riken cell bank, Japan
- C3H10 línea celular mesenquimal de ratón – Dr. Pardo, Instituto IDIS, Santiago, ES
- Cebadores – Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Células madre mesenquimales de médula ósea humana – Thermo Fisher Scientific, Wlatham, MA, USA
- Cloroformo – Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Dexametasona – Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
- E.Z.N.A. Total RNA Kit I – Omega Bio-Tek Inc., Norcross, GA, USA
- EtOH
- Factor de crecimiento insulínico I – Tebu-Bio
- Formol 4% - Thermo Fisher Scientific, Wlatham, MA, USA
- GraphPad prism: programa de análisis estadístico – GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA
- High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit – Applied Biosystems, Life Technolgies, Grand Island, NY, USA
- hMSC-TERT human mesenchymal cell line – Dr. Campana, Singapur University
- Indometacina – Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Isobutilmetilxantina – Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Kit de digestión – Lucigen, WI, USA
- LiCl – Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
- LPS – Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

USC DE COMPOSTELA

- Mezcla maestra para PCR – BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA
- Medio DMEM High Glucose – Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Medio DMEM:Hams F12 – Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
- MesenPro RS Kit Thermo Fisher Scientific, Wlatham, MA, USA
- Oligonucleótidos para siRNA – Integrated DNA Technologies, Coralville, IO, USA
- OptiMEM – Thermo Fisher Scientific, Wlatham, MA, USA
- PBS – Thermo Fisher Scientific, Wlatham, MA, USA
- Penicilina/Estreptomicina – Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Pioglitazona – Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Rojo de aceite O – Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Rojo de alizarina – Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Rosiglitazona – Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
- SaOS2 – CLS, Eppelheim, Alemania
- Selenito sódico – Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
- SiLentFect Lipid Reagent for RNAi – BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA
- Sistema de PCR en tiempo real (Quant Studio 3) – Thermo Fisher Scientific, Wlatham, MA, USA
- StemPro Adipogenesis Differentiation Kit – Thermo Fisher Scientific, Wlatham, MA, USA
- StemPro Osteogenesis Differentiation Kit – Thermo Fisher Scientific, Wlatham, MA, USA
- Suero fetal bovino – Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Tripsina/EDTA 0,5% – Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
- TriReagent – Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
- β Glicerol fosfato – Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RESULTADOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO ESTANDARIZADO PARA EL ESTUDIO DEL BALANCE OSTEOBLASTO-ADIPOCITO

1. MEDIOS DE DIFERENCIACIÓN CONSENSO

Para estudiar de forma precisa el balance entre la diferenciación osteoblastogénica y la adipogénica se usan de forma recurrente medios comerciales y MSCs primarias. Estos medios son más caros y frecuentemente de composición desconocida. Además, no existe consenso acerca de sus componentes concretos o de su optimización para diferentes líneas celulares. Por ello, se pretendió estudiar medios más económicos y fiables con una composición conocida y consensuada con la literatura.

1.1. Medio de diferenciación adipogénico

Se realizó una búsqueda en la base de datos Pubmed del término "adipogenesis protocol". Tras un análisis exhaustivo de una muestra representativa de estos artículos, se evidenció una variabilidad significativa en la composición del medio adipogénico para cada uno de sus componentes comunes (Figura 5). El 70% de los protocolos estudiados emplearon medio DMEM (con una concentración de glucosa superior a 3.15g/l) suplementado con un 10% de FBS. A pesar de esto, el tipo concreto de DMEM no fue constante a través de los diferentes protocolos. Para inducir la diferenciación de los adipocitos, en la literatura se encontraron diversos componentes constantes como los glucocorticoides (dexametasona), IBMX e insulina. Las concentraciones más frecuentes para estos reactivos fueron 1μM, 0,5mM y 10μg/ml, respectivamente. Múltiples protocolos emplearon también otros aditivos con el fin de mejorar la diferenciación adipogénica. Entre ellos, las tiazolidinedionas (rosiglitazona) y la indometacina fueron los aditivos más frecuentes (20% de los protocolos). Independientemente de la composición de los medios, el 50% de los protocolos descritos en la literatura y analizados emplearon ciclos de diferenciación y mantenimiento para inducir la diferenciación adipogénica.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

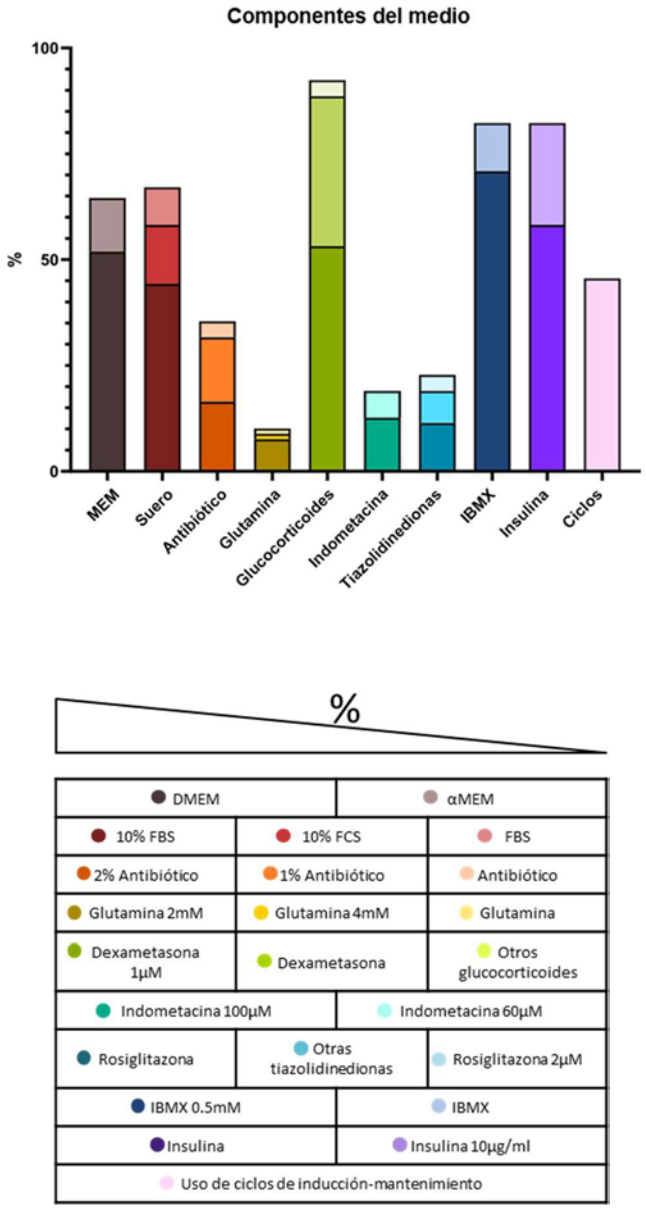
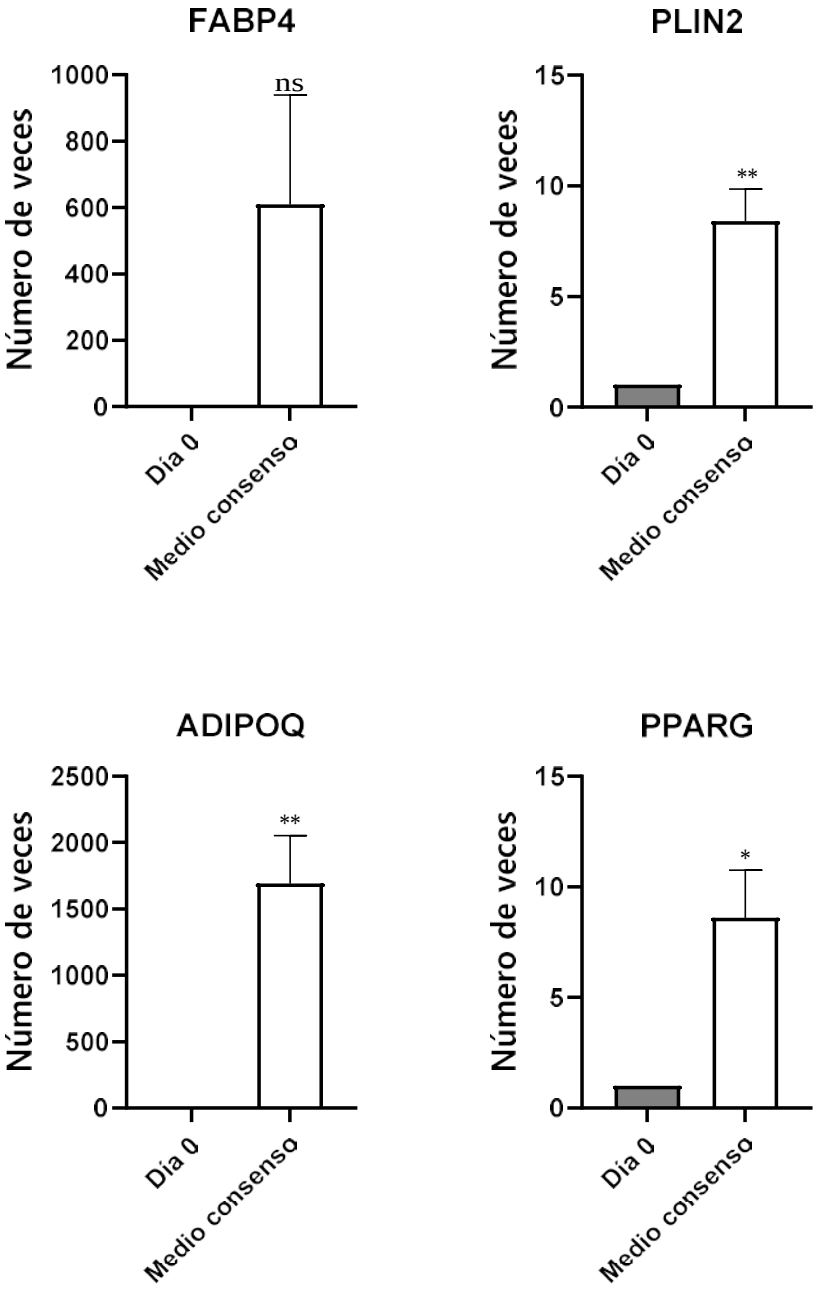


Figura 5. Composición del medio adipogénico consenso. Revisión bibliográfica de los términos adipogenesis protocol y osteoblastogenesis protocol en la base de datos PubMed.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A



USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

B

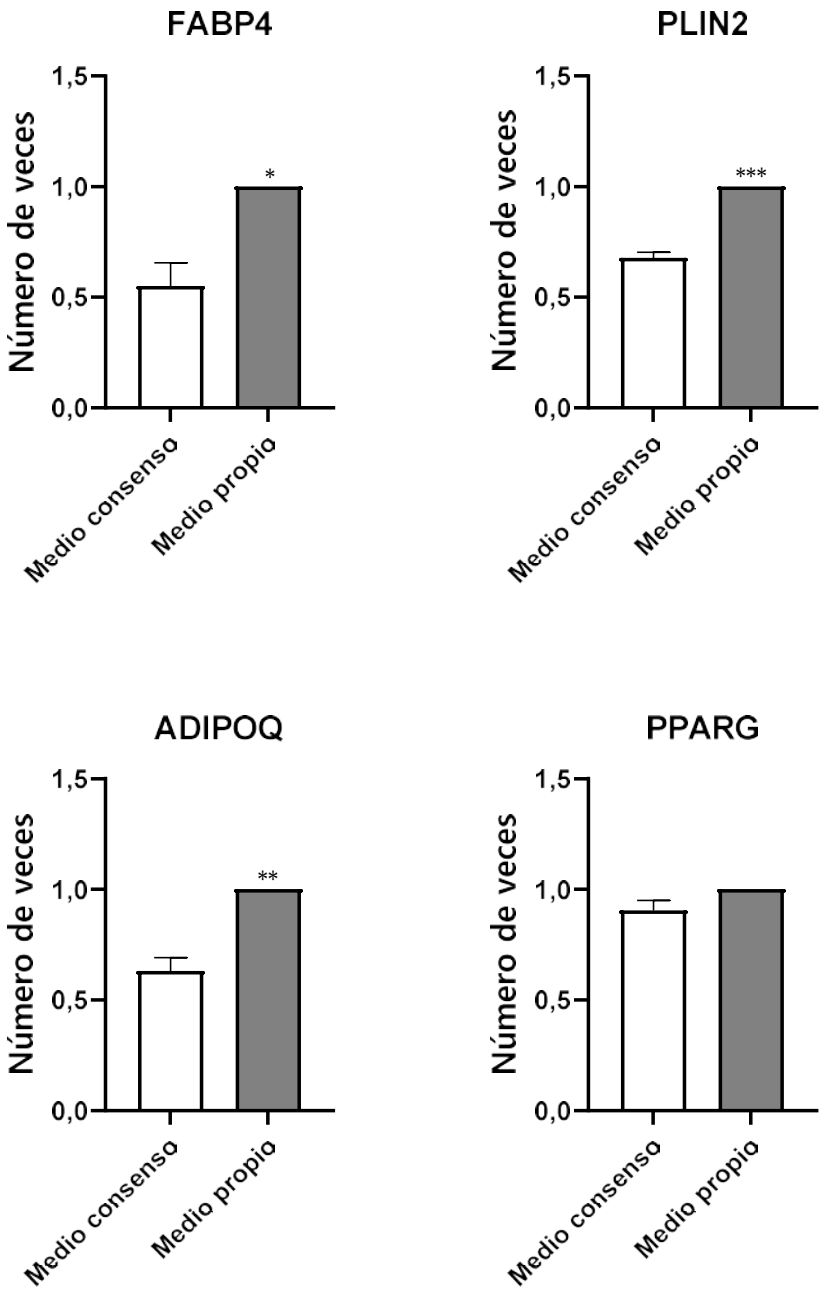


Figura 6. Diferenciación adipogénica con medio consenso y medio propio. (A-B) Expresión de los marcadores de diferenciación adipogénica FABP4, PLIN2, ADIPOQ, y PPARG medida mediante RT-PCR tras 7 días de diferenciación adipogénica con el medio consenso o el medio propio en C3H10T1/2. A) Estadística respecto al día 0. B) Estadística respecto al medio consenso.

Toda la variabilidad acumulada causada por los diferentes reactivos, concentraciones, aditivos, células y ciclos de diferenciación hace difícil determinar el medio y el protocolo más conveniente para una diferenciación adipogénica adecuada. Posteriormente, tras una lectura meticulosa de la literatura, observamos que ciertos aditivos, como el IGF1 no estaba siendo empleado como componente común del medio. Esta adición sencilla al medio de cultivo podría mejorar el proceso de diferenciación (316–320).

Seguidamente, apoyados en el análisis de la literatura, diseñamos y evaluamos la capacidad proadipogénica de un protocolo consenso que incluía los mejores reactivos y concentraciones descritos en la literatura. Como se observa en la figura 6A, el cultivo de MSCs (C3H10T1/2) durante 7 días con el medio consenso indujo un aumento fuerte y significativo de los genes marcadores de adipogénesis (PLIN2, ADIPOQ, PPARG).

Seguidamente, se estudió la suplementación de este medio con IGF1, un conocido inductor adipogénico que podría compensar la disminución de la sensibilidad insulínica en los estadios tempranos del proceso de diferenciación (321). La adición de IGF1 al medio consenso (Medio propio) incrementó de forma significativa la expresión de los genes marcadores de adipogénesis (FABP4, PLIN2, ADIPOQ) (Figura 6B).

1.2. Medio de diferenciación osteoblastogénico

Al contrario que para el medio adipogénico, un análisis profundo de la literatura acerca del medio de diferenciación osteoblastogénico reveló que la mayoría de medios se componían de los mismos aditivos, siendo estos DMEM, bajas concentraciones de dexametasona (que se ha descrito como osteoinductor usada en estas condiciones (27)), β-glicerol fosfato (necesario para el proceso de mineralización (322)) y ácido ascórbico-2-fosfato (una molécula implicada en la síntesis de colágeno (323), así como en la acción de la ALPL (324)). Como resultado, se seleccionó este medio como medio consenso osteoblastogénico para todos los experimentos. El objetivo era identificar un modelo para estudiar el balance entre las diferenciaciones osteoblastogénica y adipogénica partiendo de un punto común, la célula mesenquimal, buscando así disminuir las

influencias ambientales y celulares. Por lo tanto, con el objetico de disminuir el sesgo que podrían suponer diferentes concentraciones de glucosa, el componente principal del medio propio osteoblástico fue el DMEM con alta concentración de glucosa. Es importante señalar que se ha demostrado previamente que la concentración de glucosa no afecta a la diferenciación osteoblástica (325).

2. Evaluación de los medios de diferenciación en células mesenquimales

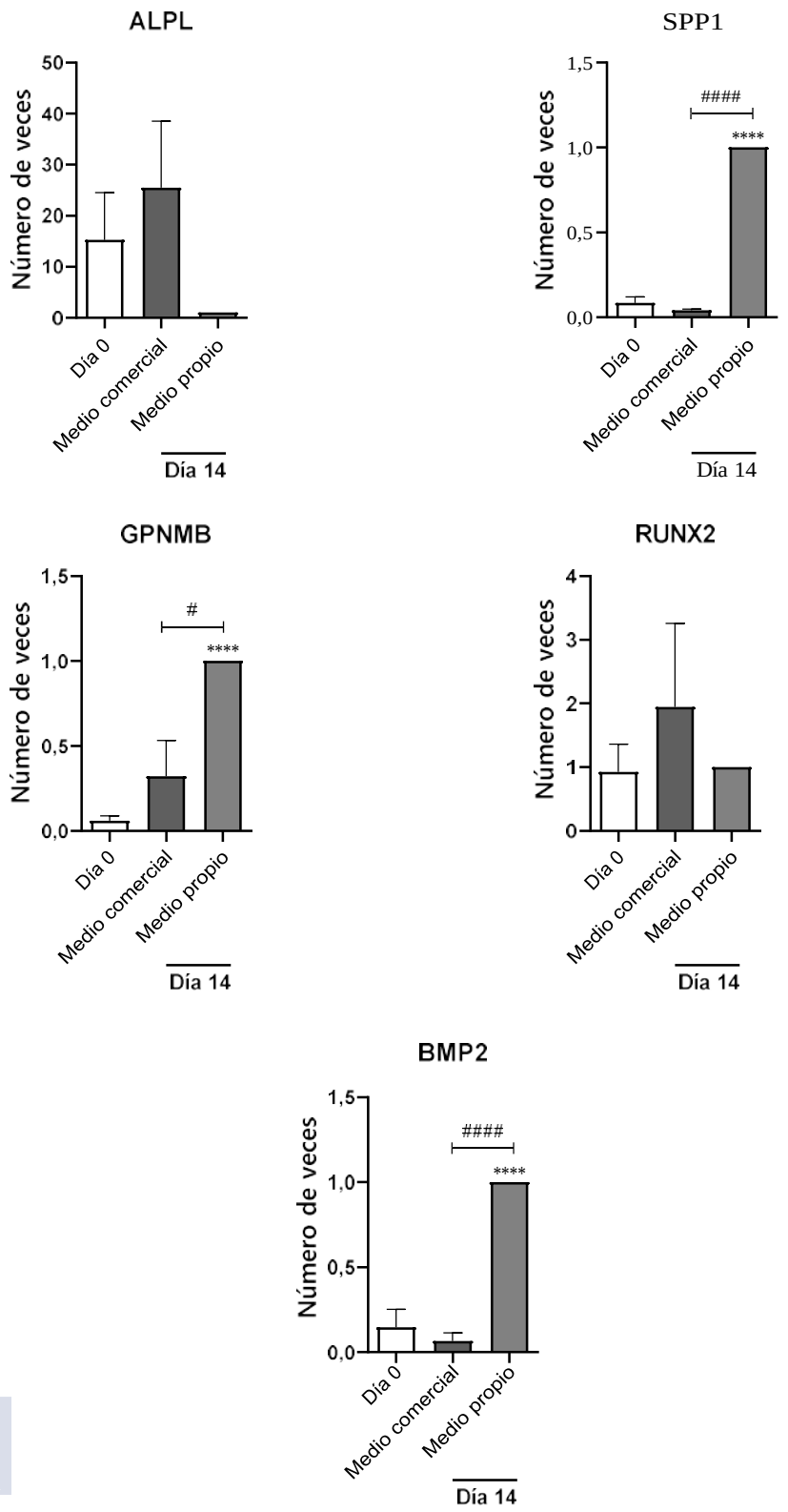
2.1. Comparación con medios comerciales en células mesenquimales primarias

Tras optimizar la composición de los medios de diferenciación de acuerdo con lo encontrado en la literatura estos medios propios (adipogénico (AD) y osteoblastogénico (OB)) se compararon con los medios comerciales en protocolos de diferenciación estándar, empleando hMSCs primarias. Las células hMSCs diferenciadas con el medio propio OB durante 14 días aumentaron los genes marcadores de osteoblastogénesis SPP1, GPNMB y BMP2. Esta expresión fue mayor que la provocada por el medio comercial de diferenciación, sugiriendo de esta forma un proceso de diferenciación más eficiente (Figura 7A). Interesantemente, ni el medio comercial ni el medio propio OB fueron capaces de modular la expresión de los genes marcadores ALPL y RUNX2.

Después de 7 días de diferenciación, el Medio propio AD fue capaz de inducir la adipogénesis en células hMSCs. Este proceso se evidenció a través de un aumento significativo de la expresión de los genes FABP4, CEBPA, PLIN2, ADIPOQ y PPARG. El medio comercial también indujo la expresión de los mismos genes, aunque, debido a su alta variabilidad, solo el aumento de expresión de PPARG y ADIPOQ fue estadísticamente significativo comparando con el día 0 (Figura 7B). Excepto el aumento de la expresión de ADIPOQ por parte del medio comercial comparado con el propio, las diferencias entre ambos medios no fueron estadísticamente significativas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A



USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

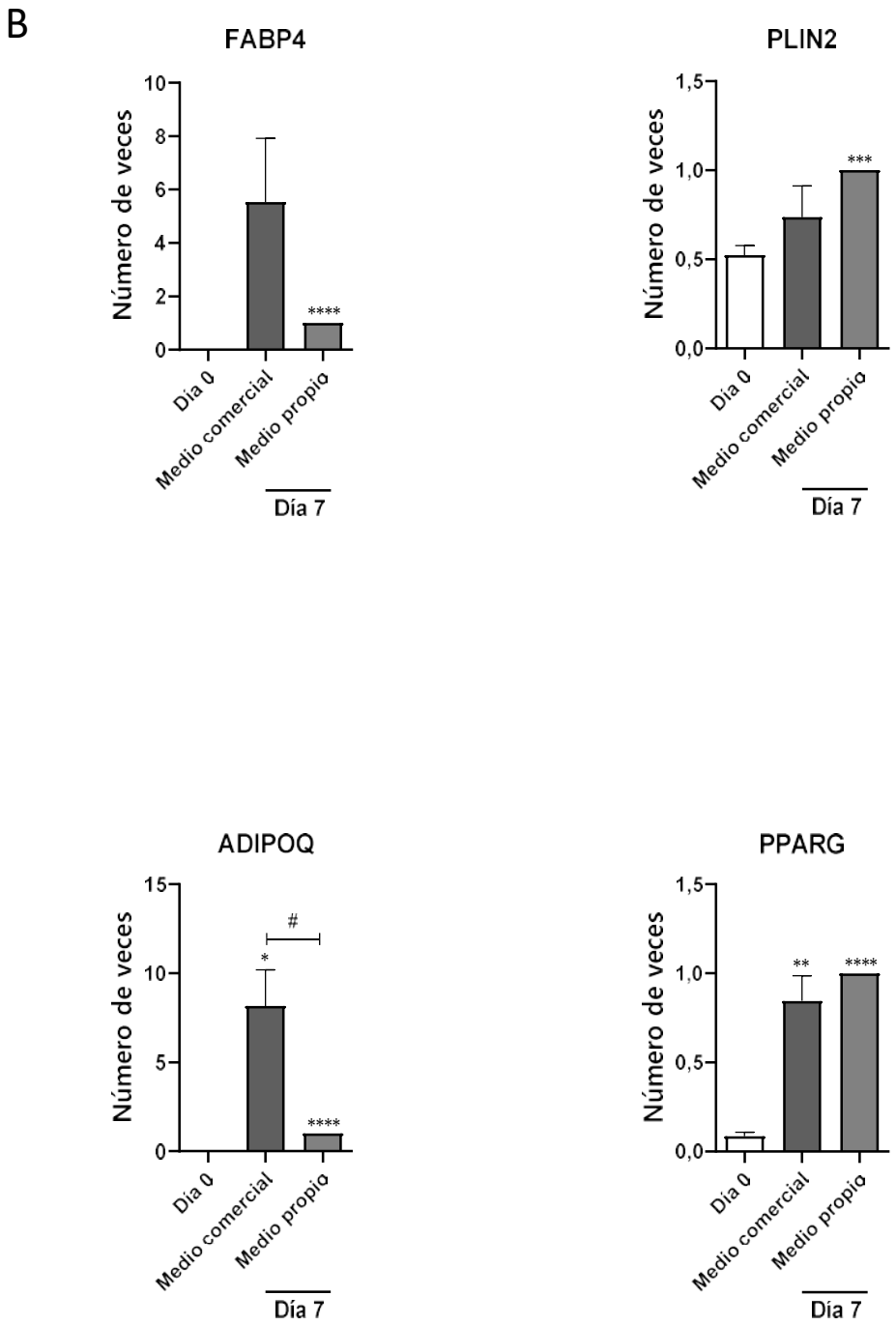


Figura 7. Comparación entre medios de diferenciación comerciales y medios propios de diferenciación. A) Expresión de los marcadores de diferenciación osteoblastogénica ALPL, SPP2, GPNMB, RUNX2 y BMP2 medida mediante RT-PCR tras 14 días de diferenciación osteoblastogénica con el medio comercial o el medio propio en hMSCs. B) Expresión de los marcadores de diferenciación adipogénica FABP4, PLIN2, ADIPOQ, y PPARG medida mediante RT-PCR tras 7 días de diferenciación adipogénica con el medio comercial o el medio propio en hMSCs. Estadística * respecto al día 0, # respecto al medio comercial.

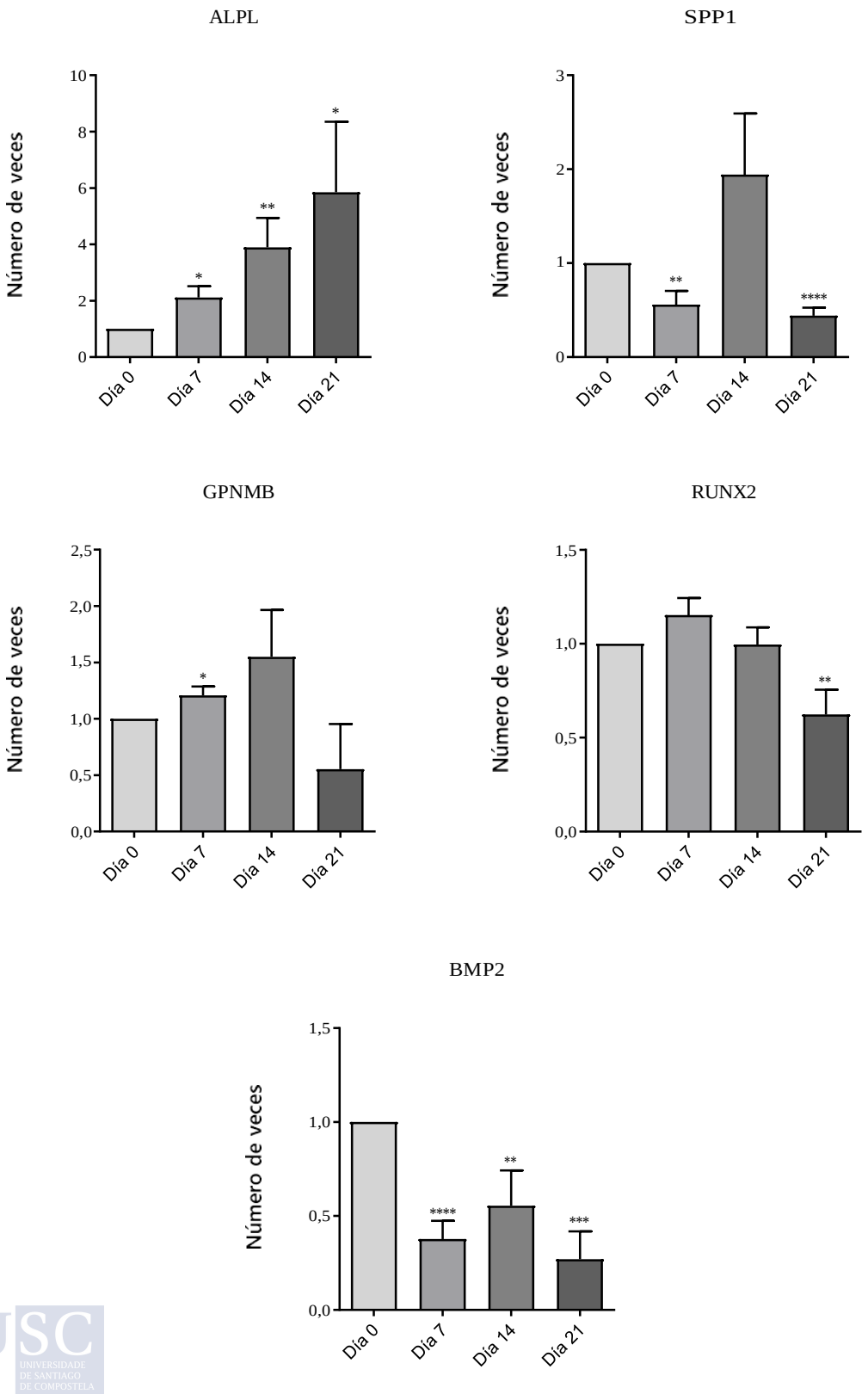
2.2. Evaluación de la predisposición de células primarias tipo-osteoblasto de pacientes envejecidos a diferenciarse a osteoblasto y adipocito

La ruptura del equilibrio entre osteoblasto y adipocito se ha asociado con varias patologías y condiciones fisiológicas (como el envejecimiento (16) o la menopausia (326), entre otras). Acorde a esto, se decidió determinar si el Medio propio propuesto permitió evaluar la predisposición de células hOB obtenidas a partir de huesos de mujeres con artrosis envejecidas a osteoblasto y adipocito. Como se muestra en la figura 8A, entre los genes marcadores osteoblásticos, solo la expresión de ALPL aumentó de forma significativa a lo largo del proceso de diferenciación osteoblástica. Esto sugiere un peor proceso de diferenciación para estas células.

De forma contraria, los genes marcadores adipogénicos FABP4, CEBPA, ADIPOQ y PPARG aumentaron su expresión de forma significativa a partir del día 14 de diferenciación (Figura 8B).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A



USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

B

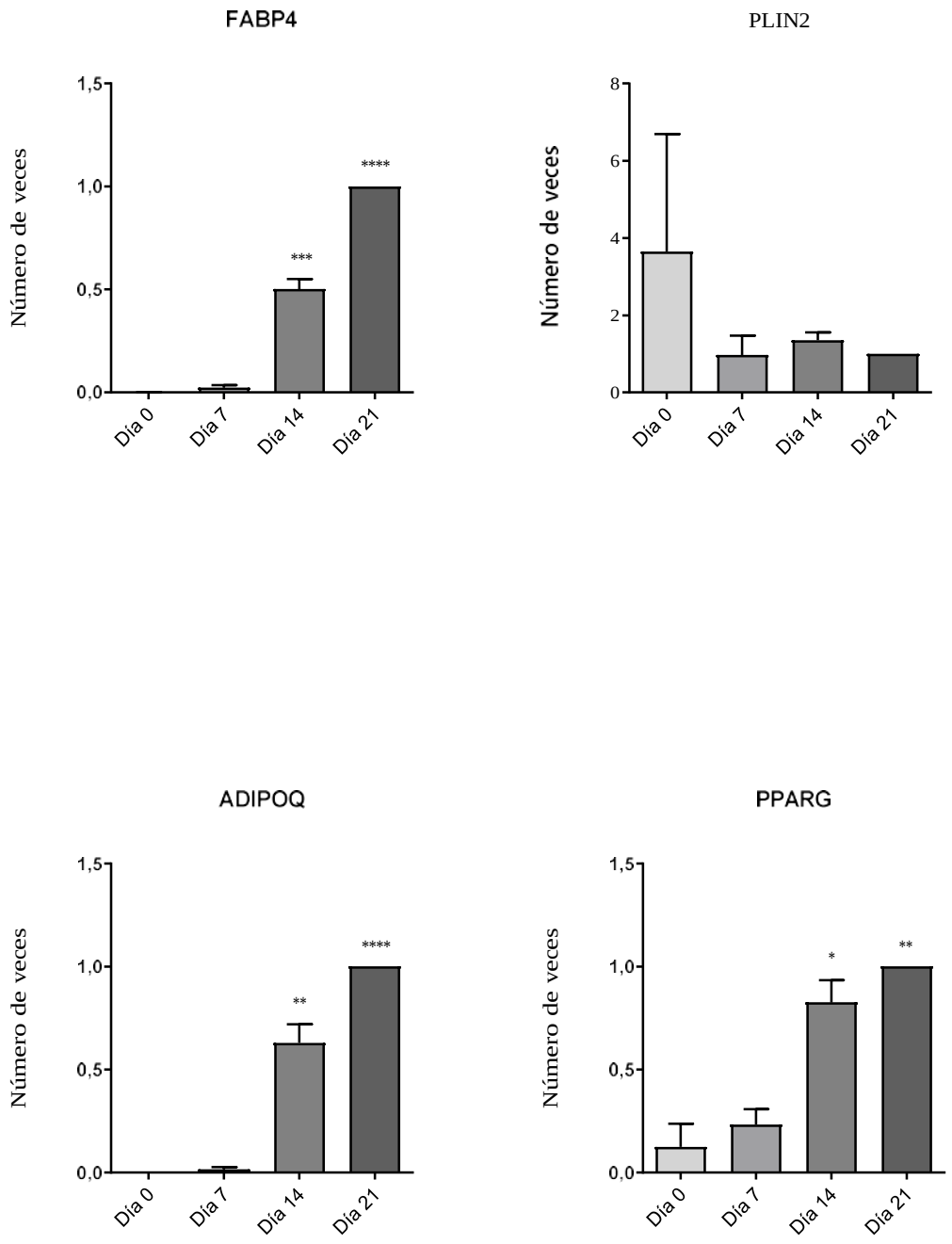


Figura 8. Diferenciación osteoblástica y adipogénica de células preosteoblásticas. A) Expresión de los marcadores de diferenciación osteoblastogénica ALPL, SPP1, GPNMB, RUNX2 y BMP2 medida mediante RT-PCR tras 21 días de diferenciación osteoblastogénica con el medio propio en hOB. B) Expresión de los marcadores de diferenciación adipogénica FABP4, PLIN2, ADIPOQ, y PPARG medida mediante RT-PCR tras 21 días de diferenciación adipogénica con el medio propio en hOB. Estadística respecto al día 0.

2.3. Líneas de MSCs

El estudio del equilibrio osteoblasto-adipocito en cultivos de MSCs primarias es el escenario ideal. No obstante, estos cultivos son caros y la variabilidad entre donantes puede dificultar la identificación de cambios en el balance osteoblasto-adipogénico. Así pues, se seleccionaron dos líneas de células mesenquimales con demostrada capacidad de diferenciación a ambos destinos celulares (C3H10T1/2 de ratón y hMSC-TERT de humano). La capacidad inductora de diferenciación de los medios propuestos se estudió a lo largo de los 21 días de diferenciación. Se empleó la expresión de ARNm de genes marcadores de ambos destinos celulares (osteoblasto y adipocito) para confirmar que los procesos de diferenciación se completaron de forma correcta.

En cultivos confluentes de células C3H10T1/2 el medio propio consensuado con la literatura (medio propio) indujo la osteoblastogénesis. Los datos obtenidos demostraron que en C3H10T1/2 los genes marcadores de osteoblasto (ALPL, SPP1, GPNMB, RUNX2) aumentaron de forma significativa a lo largo del proceso de diferenciación (Figura 9A). La tinción con rojo de alizarina reveló un aumento significativo de la mineralización del cultivo celular en esta línea celular (Figura 9B).

Interesantemente, un patrón de expresión génica semejante se observó en hMSC-TERT, aunque la expresión de SPP1 disminuyó y la de RUNX2 se mantuvo casi inalterada (Figura 9C). Apoyando estas diferenciaciones osteoblásticas, la tinción con rojo de alizarina reveló un aumento significativo de la mineralización de las células en cultivo en ambas líneas celulares, siendo más evidente en hMSC-TERT (Figura 9A).

Igual que en la osteoblastogénesis, se estudió la adipogénesis en ambas líneas celulares mesenquimales con un medio propio AD. Este medio indujo de forma significativa la expresión de genes marcadores adipogénicos en C3H10T1/2 (Figura 10A). La tinción celular con rojo de aceite O evidenció una acumulación lipídica intracelular progresiva desde el día 7 al día 21 (Figura 10B).

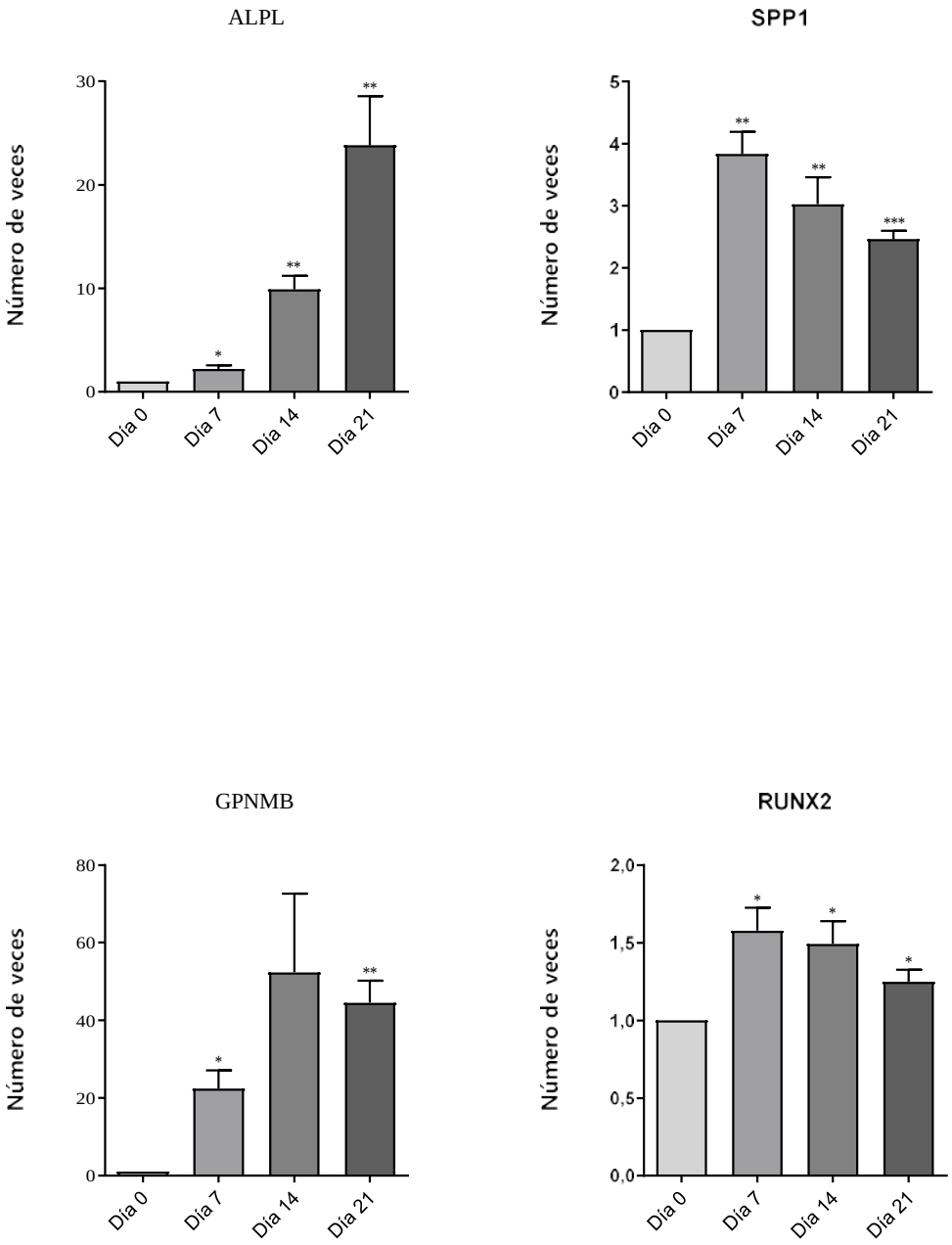
Como se observó en las células C3H10T1/2, el efecto del medio propio AD en las células hMSC-TERT indujo de forma significativa la expresión de los genes marcadores FABP4, ADIPOQ y PPARG, aunque la inducción de

PPARG no fue constante a lo largo del proceso de diferenciación (Figura 10C). Es curioso como la expresión del gen marcador PLIN2 disminuyó a día 21 en esta línea celular (Figura 10C).

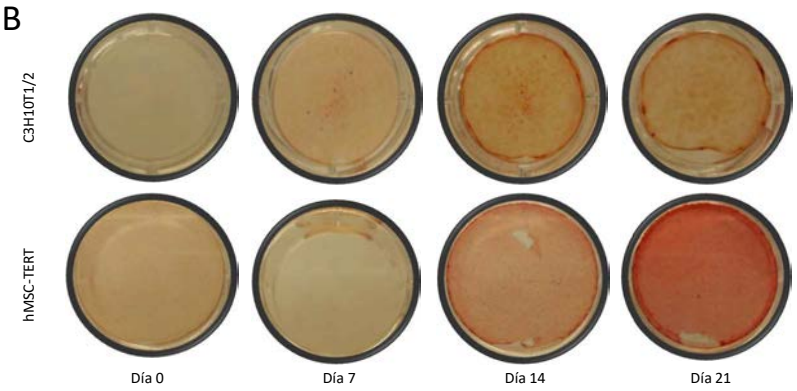
De acuerdo con el incremento en la expresión de genes marcadores de adipogénesis a día 21, la tinción con rojo de aceite evidenció a este día un aumento significativo de la acumulación lipídica intracelular en las células hMSC-TERT (Figura 10B). No obstante, la acumulación total de lípidos, así como el tamaño de las gotas lipídicas fue mayor en las células C3H10T1/2.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A



B



USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

C

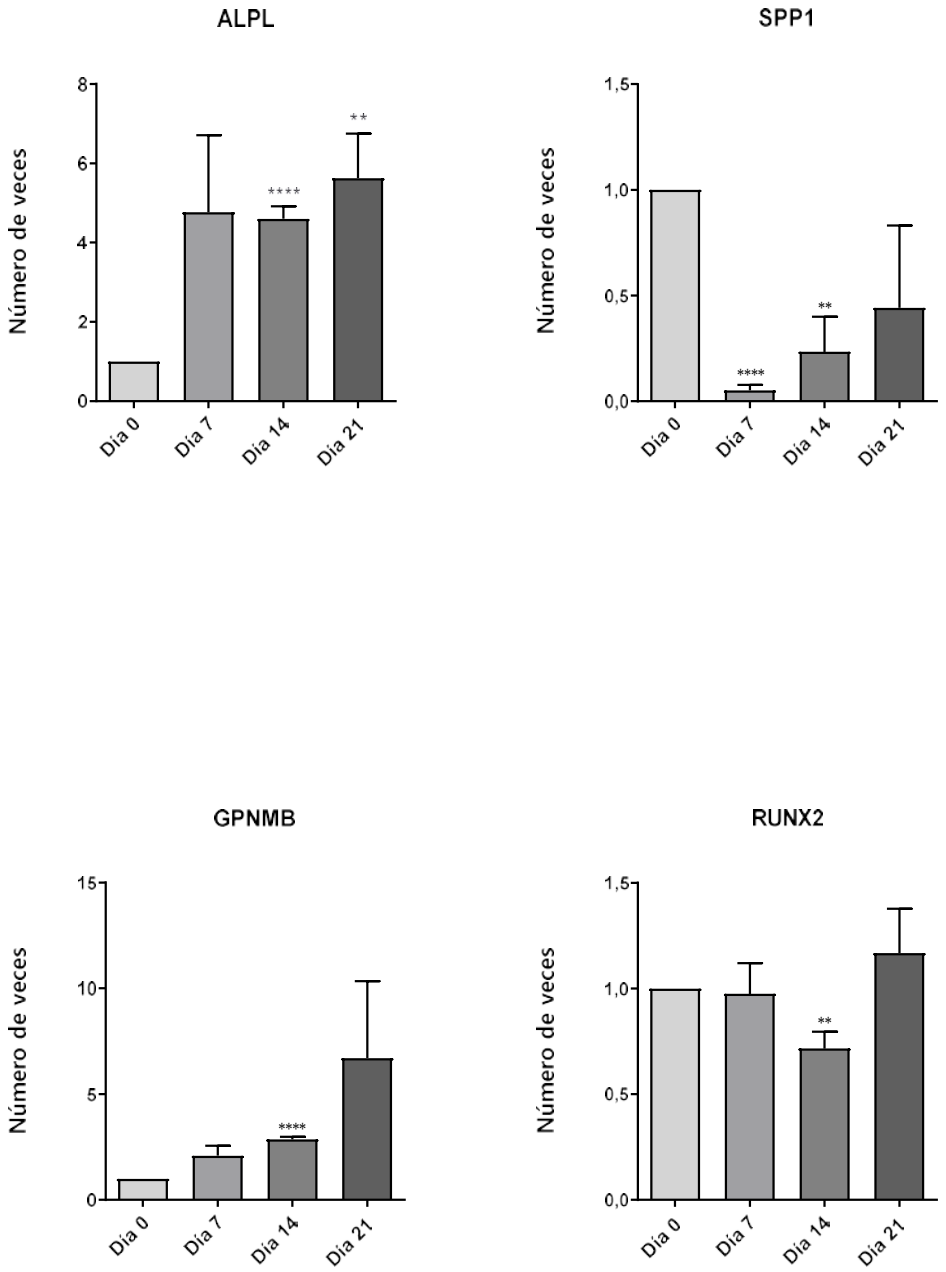
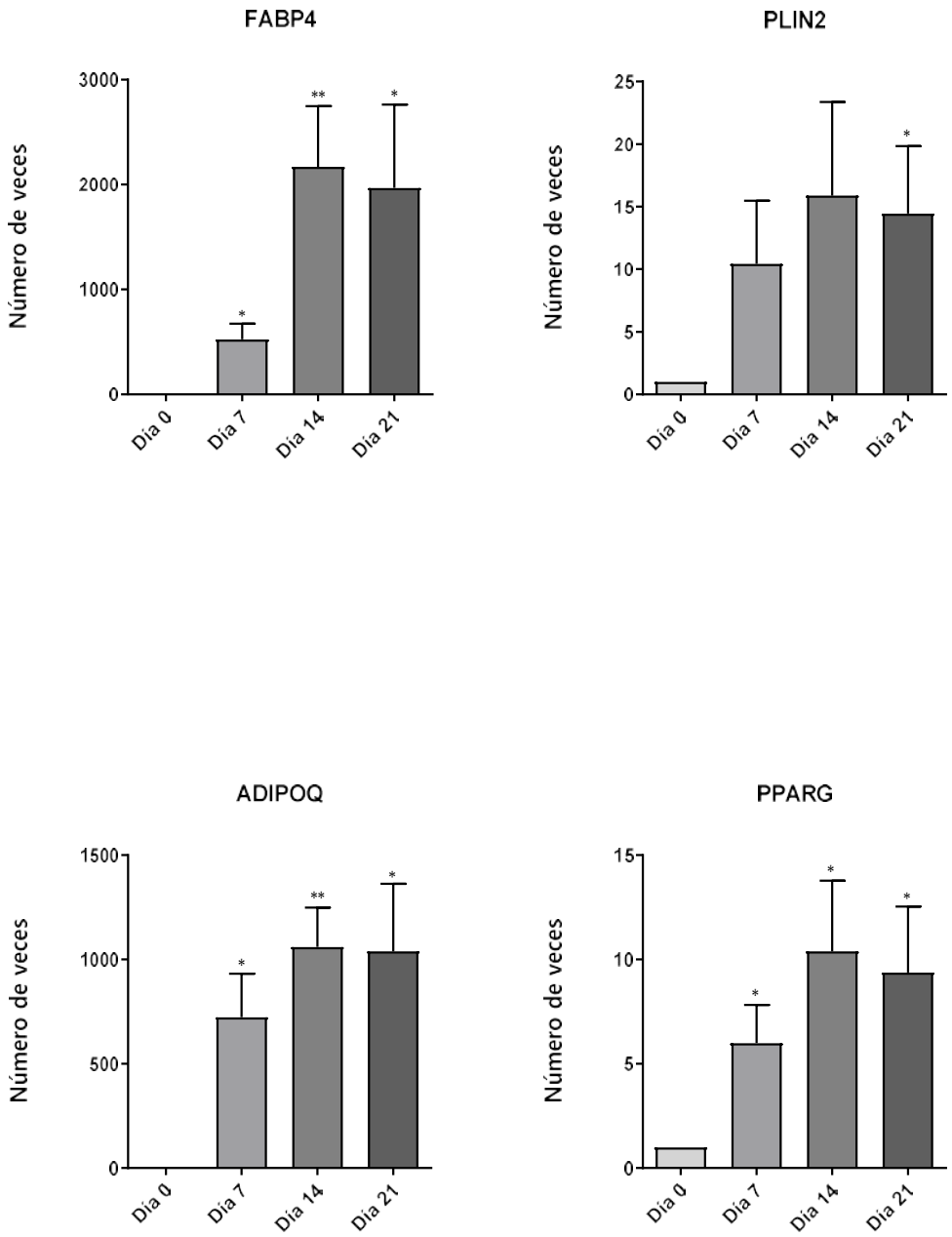
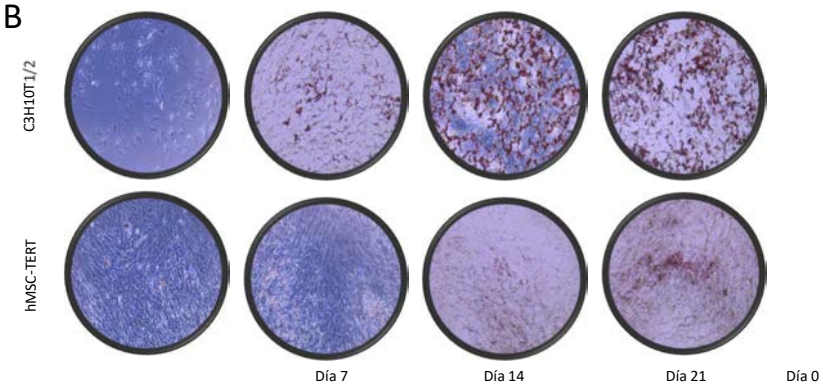


Figura 9. Diferenciación osteoblástica de líneas celulares de MSC. A) Expresión de los marcadores de diferenciación osteoblastogénica ALPL, SPP1, GPNMB y RUNX2 medida mediante RT-PCR tras 21 días de diferenciación osteoblastogénica con el medio propio en C3H10T1/2. B) Tinción de depósitos de calcio con rojo de alizarina en una diferenciación osteoblastogénica durante 21 días en células C3H10T1/2 y hMSC-TERT. C) Expresión de los marcadores de diferenciación osteoblastogénica ALPL, SPP1, GPNMB y RUNX2 medida mediante RT-PCR tras 21 días de diferenciación osteoblastogénica con el medio propio en hMSC-TERT. Estadística respecto al día 0.

A



B



USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

C

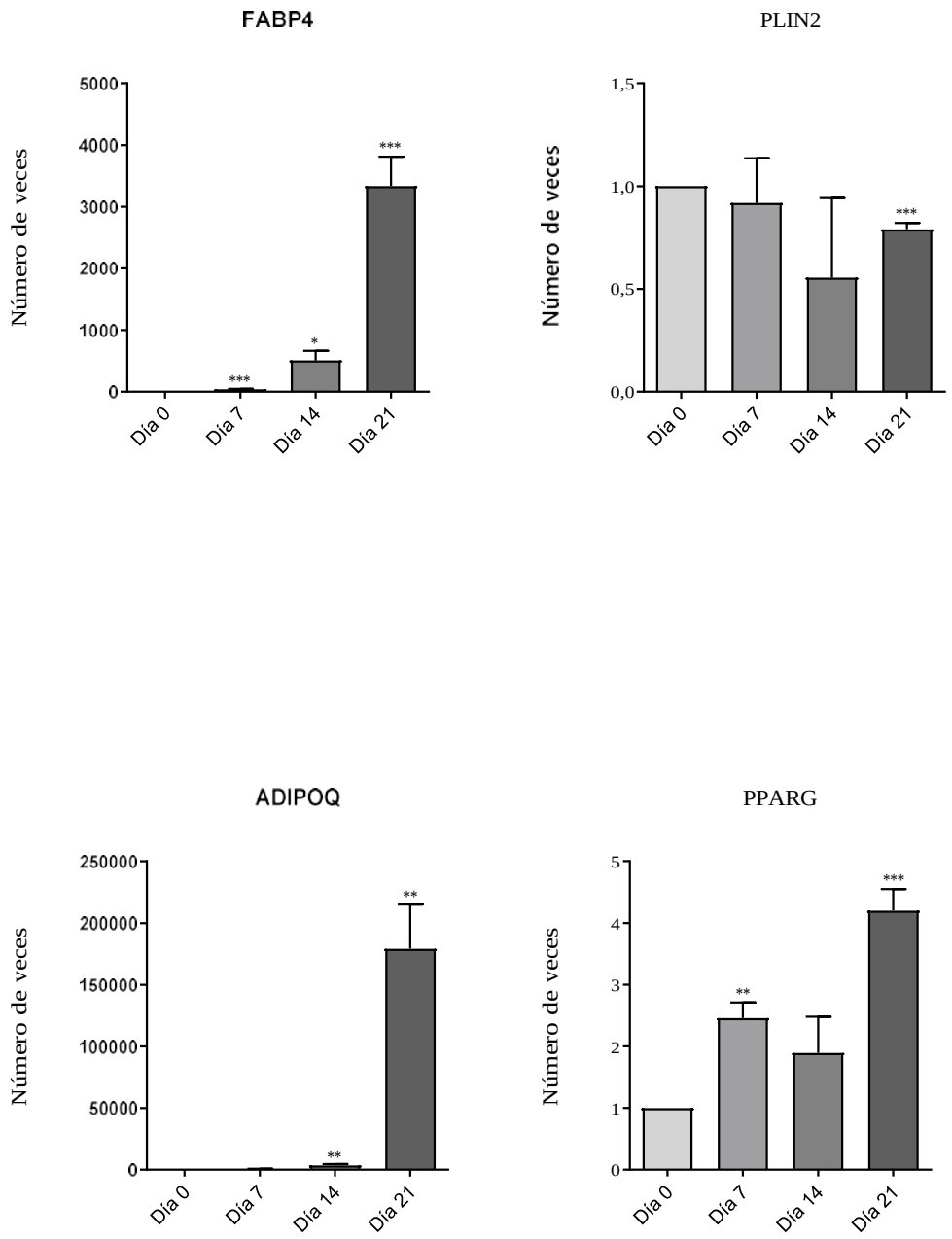


Figura 10. Diferenciación adipogénica de líneas celulares de MSC. A) Expresión de los marcadores de diferenciación adipogénica FABP4, PLIN2, ADIPOQ y PPARG medida mediante RT-PCR tras 21 días de diferenciación adipogénica con el medio propio en C3H10T1/2. B) Tinción de lípidos con rojo de aceite O en una diferenciación adipogénica durante 21 días en células C3H10T1/2 y hMSC-TERT. C) Expresión de los marcadores de diferenciación adipogénica FABP4, PLIN2, ADIPOQ y PPARG medida mediante RT-PCR tras 21 días de diferenciación adipogénica con el medio propio en hMSC-TERT. Estadística respecto al día 0.

IDENTIFICACIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN IMPLICADOS EN LA OSTEOBLASTOGÉNESIS EN UN CONTEXTO ARTICULAR Y PATOLÓGICO

1. IDENTIFICACIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN IMPLICADOS EN LA DIFERENCIACIÓN OSTEOBLÁSTICA

En un estudio previo de nuestro grupo (en revisión) se propusieron varios FTx potencialmente implicados en la promoción de la osteoblastogénesis o la inhibición de la adipogénesis. Para llevar a cabo esta identificación se evaluó el perfil de metilación de CpG en el ADN de hMSCs y de hMSCs diferenciadas a osteoblasto durante 21 días, se correlacionó este perfil de metilación con la expresión génica y se determinó si esta correlación se mantenía en las hMSC y en los osteoblastos diferenciados. Se identificaron 2462 CpGs cuyo cambio en el estado de metilación durante la diferenciación de hMSC a osteoblasto era significativamente positivo, y se estableció una correlación negativa entre su estado de metilación la expresión de sus correspondientes genes o transcritos. También se determinó cómo esta correlación solo se producía en los osteoblastos completamente diferenciados, y cómo la magnitud de esta correlación mejoraba al circunscribirse a las metilaciones localizadas en las regiones 5'UTR y a aquellos genes con un umbral de expresión mayor de un tercio del máximo de la expresión.

Una vez determinada la relación entre el estado de metilación del ADN y la expresión génica en la osteoblastogénesis, se investigó si esa firma de metilación podría identificar aquellos FTx que dirigen o determinan la diferenciación de hMSC a osteoblasto. Con el diseño de un código de R que superpone y normaliza los cambios en la metilación del ADN con los lugares de unión de los FTx determinados en la base de datos ENCODE (327), se identificaron 140 FTx. Éstos se ordenaron de acuerdo con la normalización de su ratio de enriquecimiento de lugares de unión para CpGs hipo o hipermetilados de forma diferencial durante la osteoblastogénesis, siendo los valores >0 los más enriquecidos para hipometilación y los valores <0 los más enriquecidos para hipermetilación (Figura 11). Netamente existe más desmetilación que

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

metilación. No obstante, se realizó esta ratio de enriquecimiento para determinar la relevancia relativa de cada FTx (RRF) en las modificaciones epigenéticas asociadas a la metilación del ADN. Los FTx enriquecidos más relevantes ($p<0,001$) cuyos lugares de unión se encontraban relativamente más hipometilados incluían a la subunidad SMARCC1 del complejo SWI/SNF (SMARCC1), al FTx K MAF BZIP (MAFK), al FTx JUNB, a los protooncogenes JUN y FOS y al transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3), algunos de los cuales se encuentran fuertemente relacionados con el metabolismo óseo (328). Como se ha descrito en numerosas ocasiones, se ha establecido que los factores que promueven la osteoblastogénesis tienen el efecto contrario en la adipogénesis y viceversa (17). Concordando con este hecho, percibimos que una sección importante de los FTx cuyos lugares de unión se encuentran significativamente hipermetilados ($p<0,001$) se asociaban con la promoción de la adipogénesis (potenciador del homólogo zeste 2 (EZH2), dedo de zinc 143 (ZNF143), factor de transcripción 1 de unión de elementos reguladores de esterol (SREBP1) y la proteína 2 de unión C-terminal (CTBP2)) (329–334).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

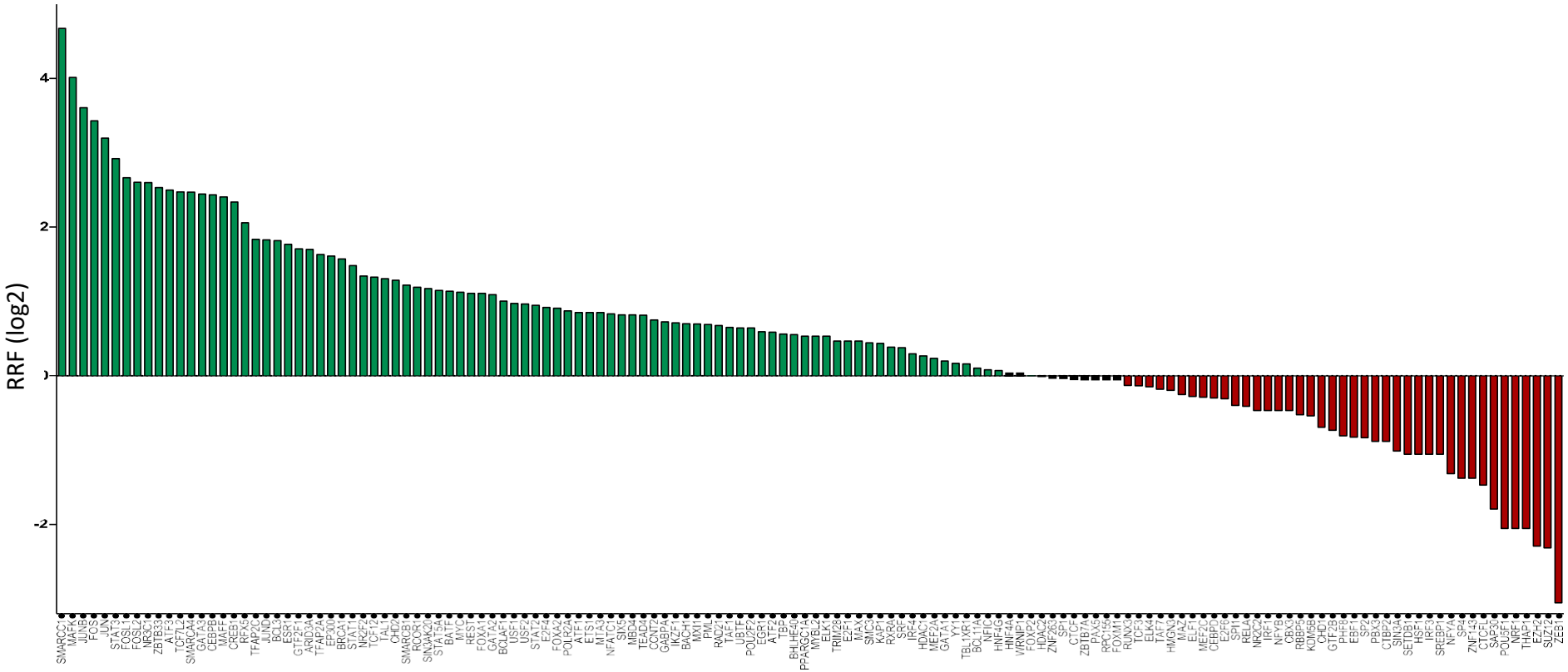


Figura 11. RRF de los FTx potencialmente implicados en la osteoblastogénesis. Resultado del algoritmo REINS que superpone CpGs hipo o hipermetiladas y FTx para sugerir una actividad potencial en un proceso. Las barras representan el $\log_2$ de la medida RRF (Relevancia relativa de un factor) para los FTx estudiados en el proceso de la osteoblastogénesis. RRF es la ratio del porcentaje de enriquecimiento en CpGs hipometiladas respecto al porcentaje de enriquecimiento de CpGs hipermetiladas para un FTx dado.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN MODULADORES DE LA OSTEOBLASTOGÉNESIS EN TEJIDO ÓSEO Y GRASO ARTICULAR SANO Y PATOLÓGICO

2.1. Expresión de los factores de transcripción en hueso articular y grasa infrapatelar

Una vez identificados los FTx con potencial regulador de los procesos osteoblástico y/o adipogénico, seleccionamos el 25% de los FTx con mayor RRF para la hipometilación e hipermetilación. Para estos FTx, determinamos mediante RT-PCR su expresión en tejido óseo articular humano. Partiendo de que el estudio de la potencial actividad epigenética de estos factores se llevó a cabo en células hMSCs diferenciadas durante 21 días, tiempo suficiente para adquirir un fenotipo osteoblástico completo. Por ello, su expresión en tejido articular se determinó en muestras óseas de cadera (sana y artrósica), rodilla (sana y artrósica) y osteofitos, aportando con estas localizaciones anatómicas un contexto articular a los resultados obtenidos (Figura 12A). Con el fin de determinar el perfil fenotípico (osteoblástico y adipogénico) de cada uno de estos tejidos se analizó también la expresión de genes marcadores de osteoblastogénesis (ALPL, SPP1, GPNMB, RUNX2 y BMP2) y de adipogénesis (FABP4, PLIN2, ADIPOQ y PPARG).

Buscando relacionar las modificaciones epigenéticas con la expresión de los FTx en el tejido óseo, se realizó un análisis de Fisher que confirmó que el estado de metilación de los FTx estaba significativamente relacionado con el hecho de estar más o menos expresado en este tejido (Figura 12B). Este dato sugiere que los FTx cuyos lugares de unión se encuentran relativamente hipermetilados tienen alguna actividad biológica que debe ser controlada en el tejido óseo maduro.

Buscando las diferencias entre tejido óseo y adiposo se realizó el mismo análisis en muestras de grasa infrapatelar (Figura 13A). En este tejido las modificaciones epigenéticas relativas a la metilación del lugar de unión no mostraron relación estadísticamente significativa con la magnitud de la expresión (Figura 13B). Este hecho podría ser debido a que el análisis del estado

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de metilación se realizó en una diferenciación osteoblástica y podría no coincidir con el perfil de un tejido adiposo.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

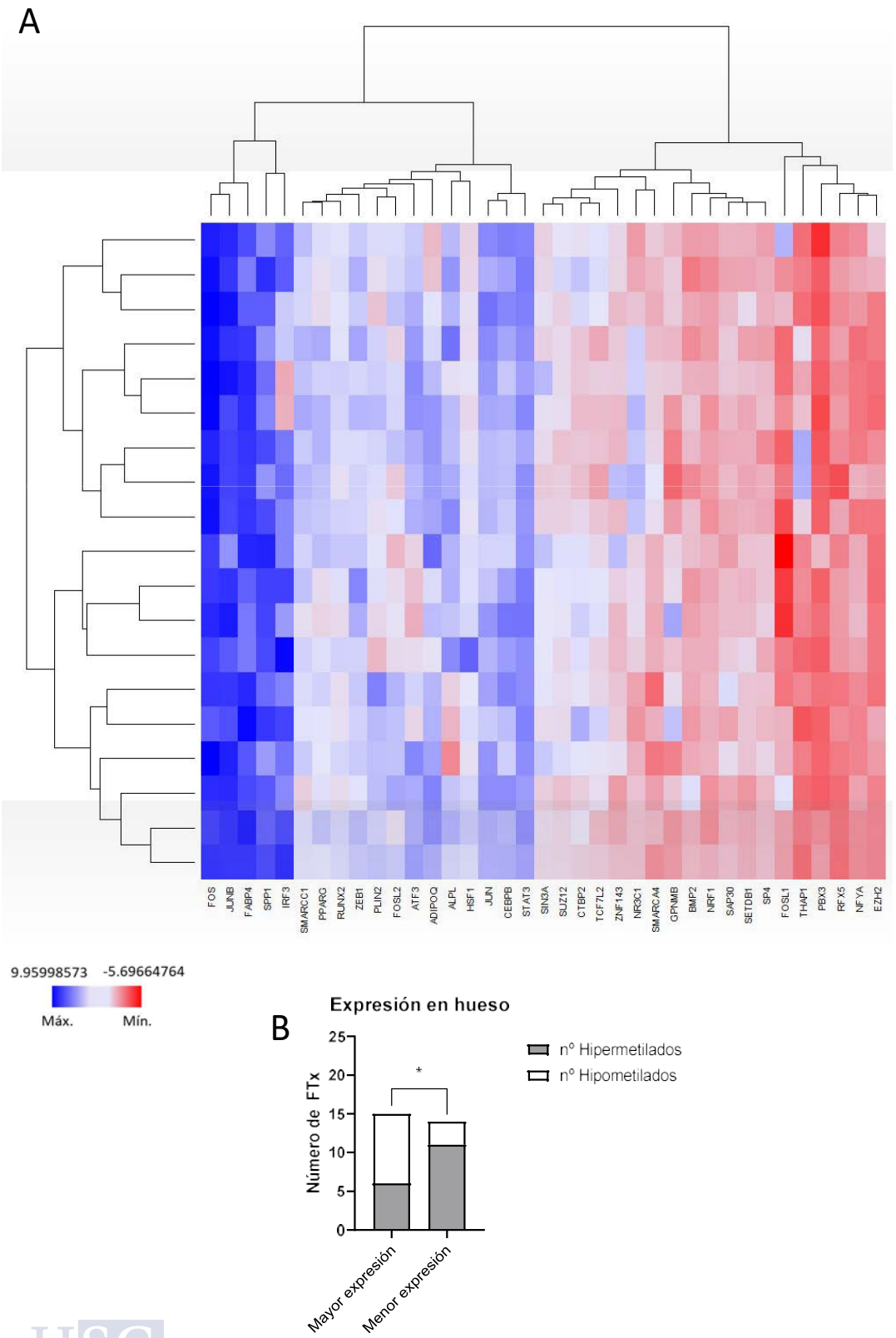


Figura 12. Mapa de calor de la expresión de los factores de transcripción seleccionados, marcadores de diferenciación osteoblástica y adipocítica en muestras humanas de hueso. A) Expresión medida por RT-PCR de los FTx y genes marcadores de diferenciación (ALPL, SPP1, GPNMB, RUNX2, BMP2, FABP4, PLIN2, ADIPOQ y PPARG) en muestras de hueso obtenidas de pacientes. B) Análisis de Fisher de la relación entre el estado de metilación de los lugares de unión de un FTx y el hecho de expresarse más o menos en las muestras de hueso analizadas.

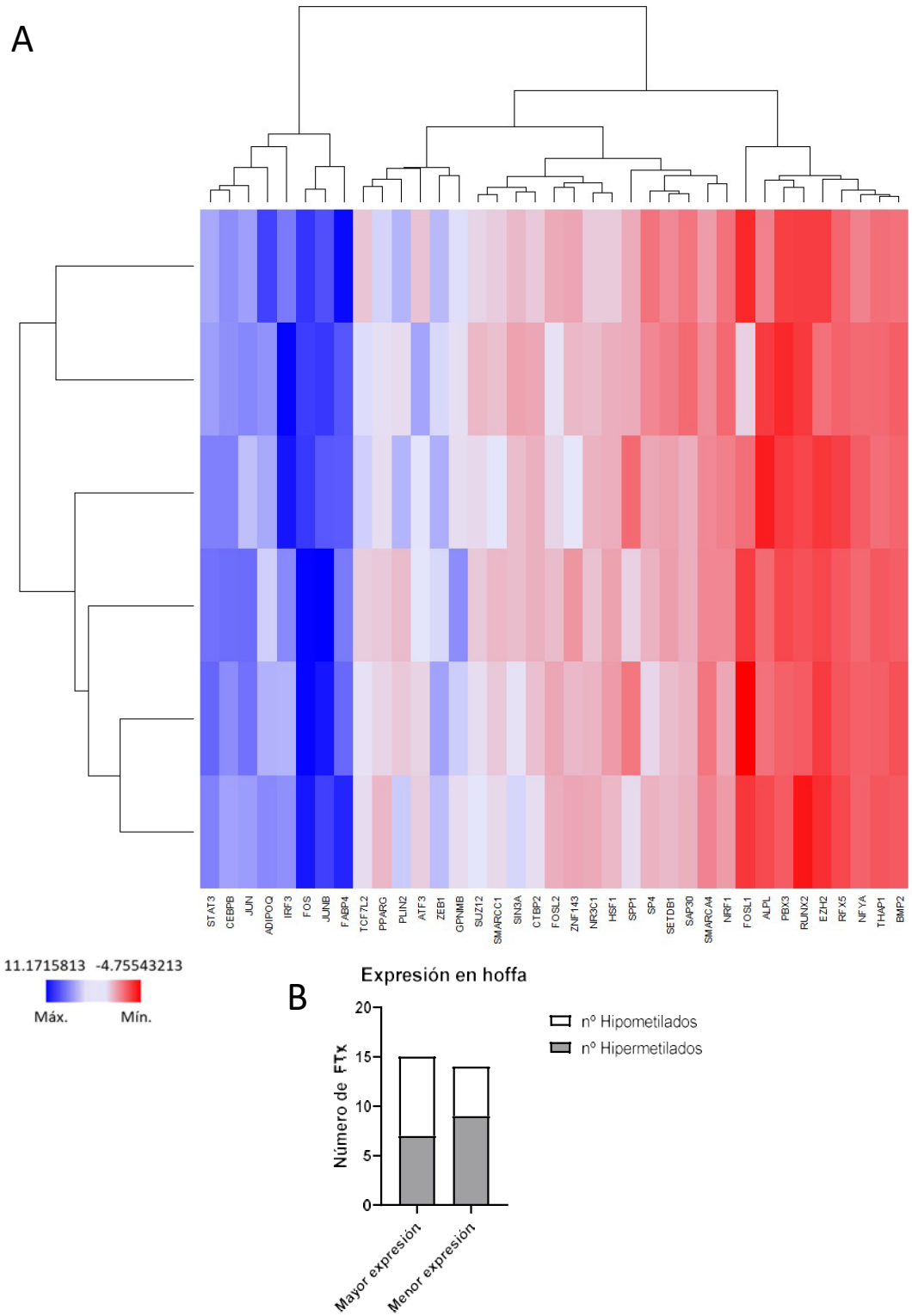


Figura 13. Mapa de calor de la expresión de los factores de transcripción seleccionados, marcadores de diferenciación osteoblástica y adipocítica en muestras humanas de grasa infrapatelar. A) Expresión medida por RT-PCR de los FTx y genes marcadores de diferenciación (ALPL, SPP1, GPNMB, RUNX2, BMP2, FABP4, PLIN2, ADIPOQ y PPARG) en muestras de grasa infrapatelar obtenidas de pacientes. B) Análisis de Fisher de la relación entre el estado de metilación de los lugares de unión de un FTx y el hecho de expresarse más o menos en las muestras de grasa infrapatelar analizadas.

2.2. Correlación entre la expresión de los factores de transcripción y los marcadores de destino celular

Una vez conocidos los niveles de expresión de cada FTx en los diferentes tejidos y situaciones patológicas, mediante un análisis estadístico con R, se estudió como sus expresiones correlacionaban entre sí y con los genes marcadores de diferenciación osteoblástica y adipocítica. En la figura 14A se observa la existencia de una asociación altamente significativa ($p>0,0001$) entre la variable signo de la correlación y el hecho de correlacionar con los marcadores de diferenciación de un destino celular u otro (osteoblastos o adipocito).

Tras la identificación del potencial efecto perjudicial de alguna de las actividades de los FTX hipermetilados en el hueso representamos de forma gráfica las correlaciones de estos FTx entre sí y con los marcadores de diferenciación de ambas estirpes celulares. Dentro de las correlaciones significativas estadísticamente ($p<0,05$) se estableció un límite en el coeficiente de correlación ($r>0,5$, $r<-0,5$) para identificar aquellas con una relevancia biológica real. En la figura 10B se observan varios nodos de FTx y genes marcadores de diferenciación que correlacionan positivamente entre sí. Es de interés que los genes marcadores de osteoblastogénesis RUNX2, BMP2, SPP1 y ALPL correlacionan entre si formando un nodo solo conectado con los FTx por las correlaciones de SPP1 y RUNX2 con el factor 1 de choque térmico (HSF1). En la situación contraria, los marcadores de diferenciación adipogénica (ADIPOQ, PPARG, FABP4 y PLIN2) forman un nodo de correlación entre sí, pero altamente correlacionado con otros FTx como el FTx SP4. Es de relevancia como existe una agrupación de varios FTx formando un nodo de fuertes correlaciones entre sí donde se incluyen: el miembro A de la familia de FTx SIN3 (SIN3A), la proteína asociada a SIN3A de 30kDA (SAP30), la histona lisina-metiltransferasa 1 con el dominio SET bifurcado (SETDB1), la homeobox 1 de unión al E-boxing (ZEB1), la homeobox 3 PBX (PBX3), la subunidad SUZ12 del complejo represor del Polycomb (SUZ12), la subunidad α del FTx nuclear Y (NFYA), el factor respiratorio nuclear 1 (NRF1) y el FTx SP4.

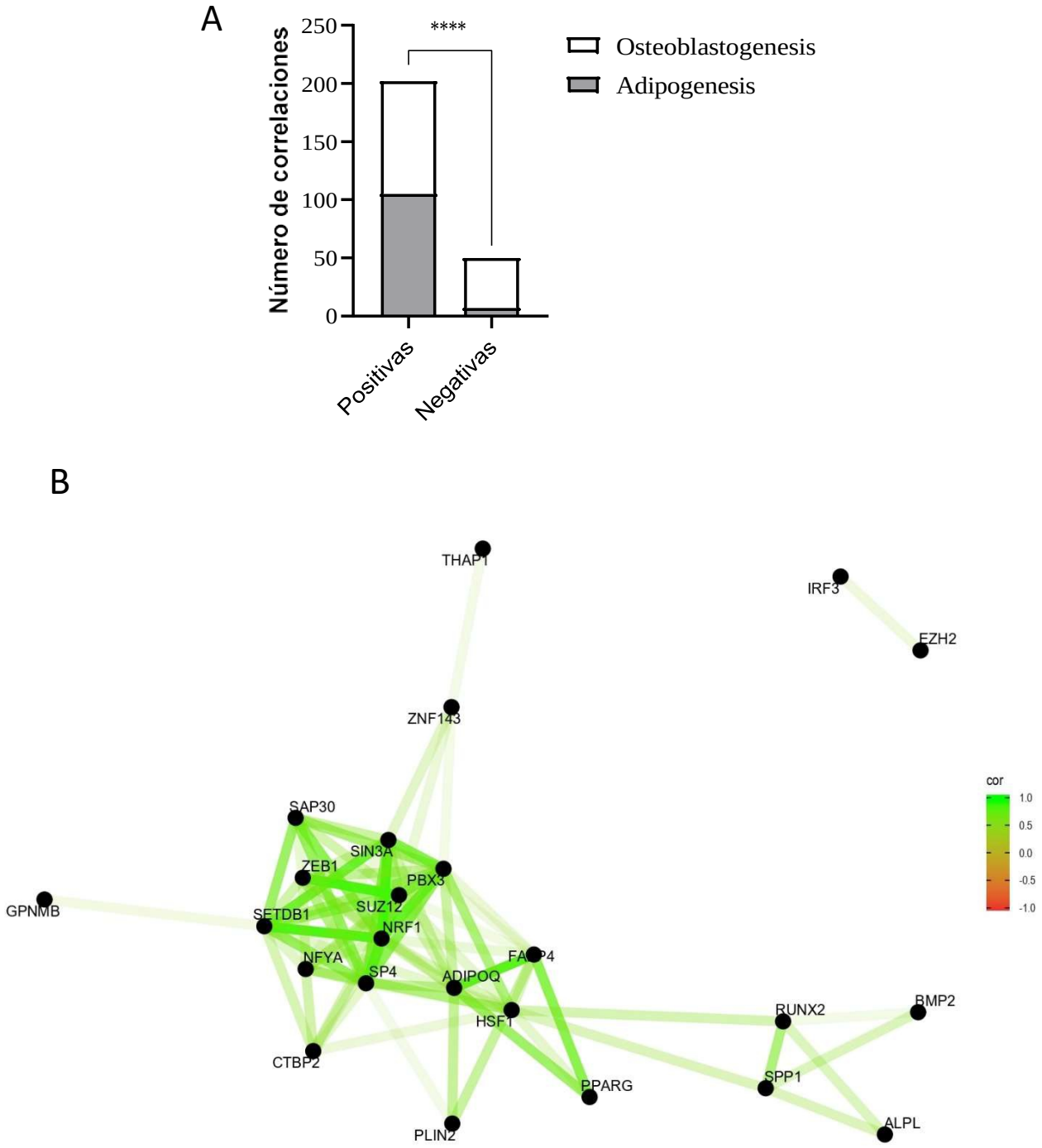


Figura 14. Correlaciones entre los FTx y los marcadores de diferenciación osteoblástica y adipocítica. A) Análisis de Fisher de la relación entre el signo de las correlaciones de los FTx y el hecho de correlacionar más o menos con marcadores de osteoblastogénesis (ALPL, SPP1, GPNMB, RUNX2 y BMP2) o de adipogénesis (FABP4, PLIN2, ADIPOQ y PPARG). B) Correlaciones con p<0,5 y coeficiente de correlación (r) >|0,5| entre los FTx con sus lugares de unión hipermetilados, marcadores de diferenciación osteoblsatogénica y adipogénica.

2.3. Selección de los factores de transcripción objeto de estudio

Con el fin de determinar aquellos FTx más implicados en la osteoblastogénesis desde una óptica de modulación del balance osteoblástico-adipocítico, se buscaron aquellos con mayor variabilidad en su expresión entre tejidos. Examinando la figura 14B se evidenció la existencia de un nodo de FTx que correlacionaban entre sí con un alto coeficiente de correlación ($r > 0,5$) y suficiente potencia estadística ($p < 0,05$) como para suponer un trabajo coordinado entre ellos. Para determinar su potencial implicación en el equilibrio osteoblasto-adipocito y sus diferencias de expresión entre tejido óseo y graso se relacionó su expresión en ambos tejidos (Figura 15). Concordando con lo observado en la figura 14B donde el conjunto de FTx tiene varias correlaciones con la agrupación de marcadores de adipogénesis, su expresión en grasa es mayor que en hueso (Figura 15). Examinando las figuras 12A y 13A se observa que las expresiones de SETDB1, SAP30 y SP4 a lo largo de las diferentes muestras de tejido aparecen agrupadas según el dendograma. En los extremos de las diferencias entre tejidos se sitúan SUZ12 y ZEB1 como los FTx con mayor diferencia, y NFYA y PBX3 como los FTx con una menor diferencia, siendo su expresión en ambos tejidos prácticamente igual. Se sabe que SIN3A y SAP30 pertenecen al complejo histona deacetilasa. La RRF de SIN3A es menor que la de SAP30 (Figura 11) y su evidencia de asociación con otros de los FTx estudiados es menor (Figuras 12A y 13A). Teniendo en cuenta estos antecedentes seleccionamos 6 FTx: NRF1, SAP30, SETDB1, SP4, SUZ12 y ZEB1 (de aquí en adelante se empleará el término nodo para referirse al conjunto de estos 6 FTx) para examinar su efecto sobre la osteoblastogénesis y sobre el balance osteoblasto-adipocito.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

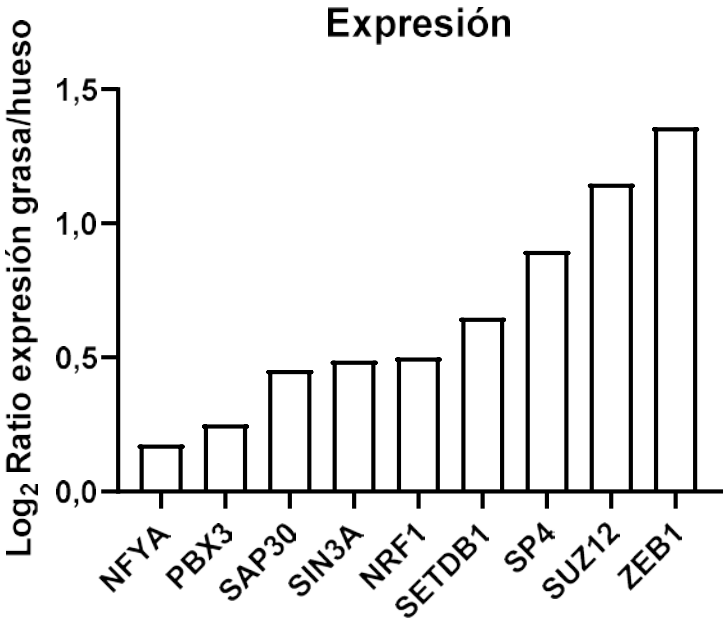


Figura 15. Relación de la expresión de una selección de FTx en hueso y grasa. Log_2 de la ratio entre la expresión medida por RT-PCR en hueso y grasa infrapatelar de los FTx.

3. EXPRESIÓN DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DURANTE LA OSTEOBLASTOGÉNESIS Y LA ADIPOGÉNESIS.

Con el fin de establecer un papel en la regulación de la osteoblastogénesis a través de la regulación de su equilibrio con la adipogénesis se empleó el modelo *in vitro* descrito y optimizado en la primera sección de resultados. De esta forma, se midió la expresión de los FTx NRF1, SAP 30, SETDB1, SP4, SUZ12 y ZEB1 a los días 0, 7, 14 y 21 de diferenciación osteoblástica y adipocítica de C3H10T1/2 (Figura 16). Como se observa en la figura 16, todos los FTx pertenecientes al nodo, excepto NRF1, aumentan su expresión tras 7 de osteoblastogénesis. En la adipogénesis NRF1, SETDB1, SUZ12 y ZEB1 ven reducida su expresión a días tardíos (14 y 21 días).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

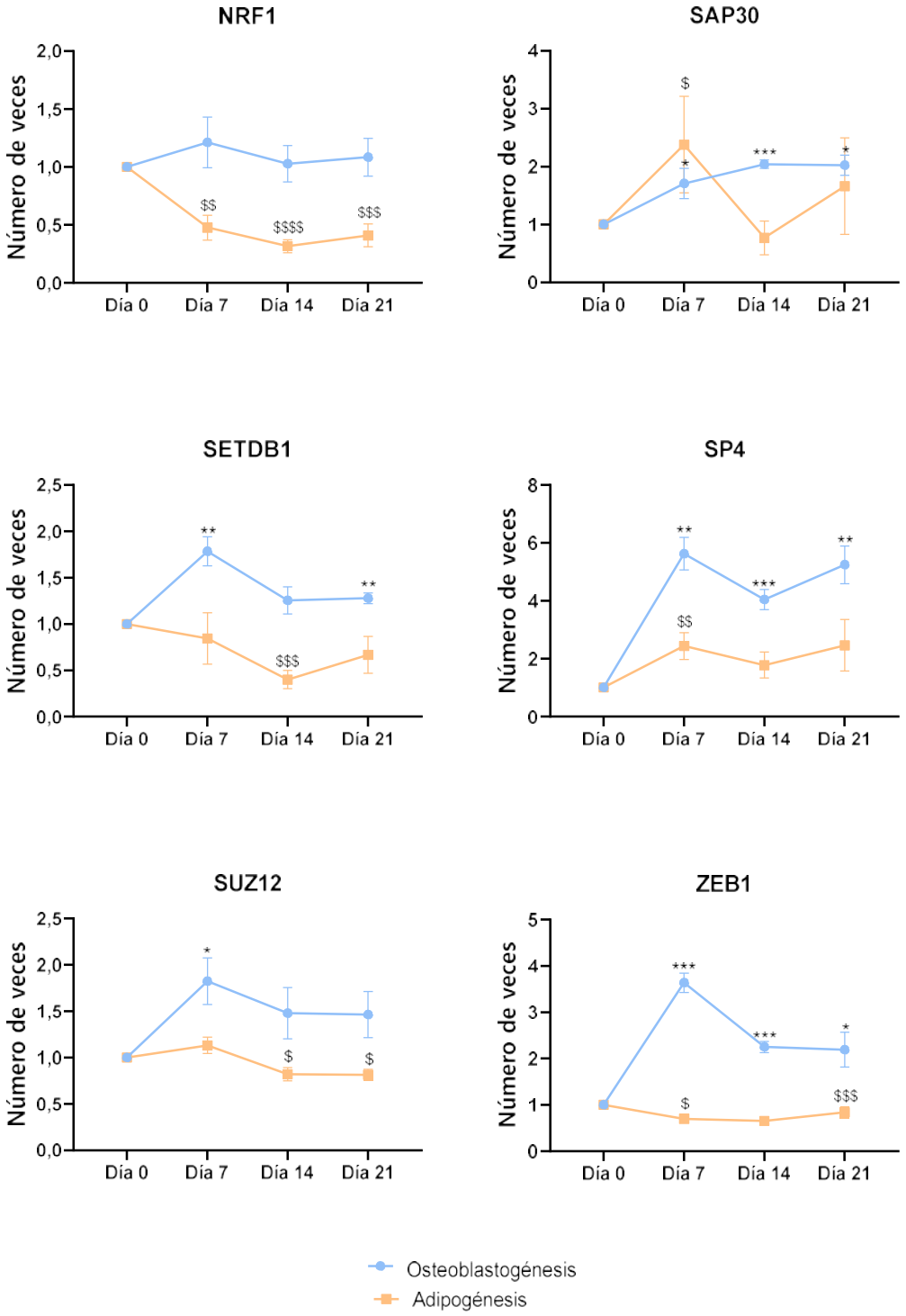


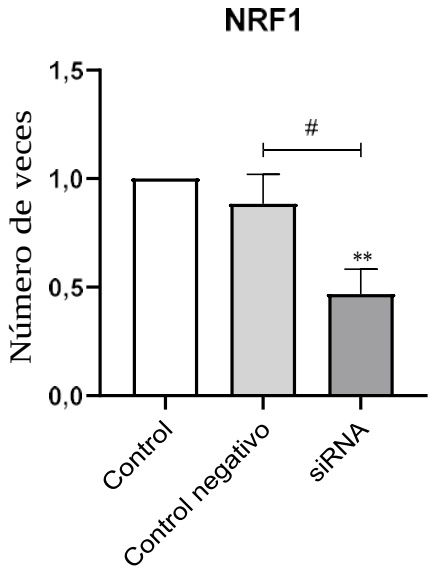
Figura 16. Expresión de los factores de transcripción del nodo en la osteoblastogénesis y la adipogénesis. Expresión medida mediante RT-PCR de los FTx del nodo a días 0, 7, 14 y 21 de diferenciación osteoblástica y adipogénica de C3H10T1/2. Estadística respecto al día 0.

4. SILENCIAMIENTO DEL NODO

Buscando esclarecer el mecanismo de acción de los FTx del nodo en la osteoblastogénesis y la adipogénesis se llevó a cabo un silenciamiento de cada uno de los genes en ambos procesos. Como se ha visto en las figuras 9A y 8A a día 7 existen resultados significativos ($p<0,05$) de la modulación de los genes marcadores tanto de osteoblastogénesis como de adipogénesis. Por ello, y sabiendo que el efecto del silenciamiento no es estable más allá de las 96 primeras horas, se realizaron los experimentos durante los primeros 7 días de diferenciación.

4.1. Silenciamiento de NRF1

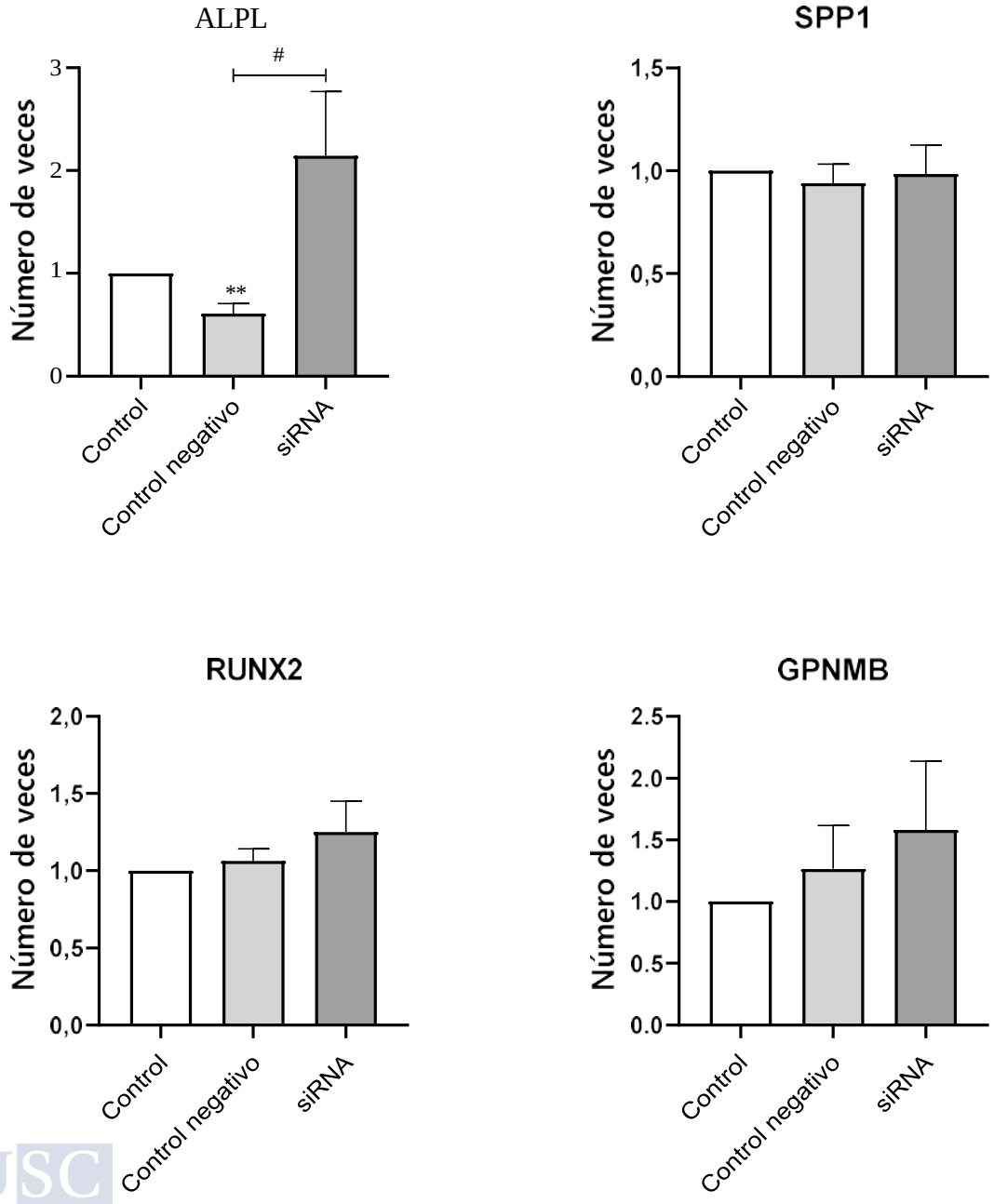
Como se muestra en la figura 17A se confirmó la eficacia del silenciamiento del gen NRF1 mediante la técnica del siRNA en el momento de inicio del experimento (día 0), reduciendo su expresión en un 63%. En el punto de control a día 7 se observó un aumento en la expresión de ALPL (Figura 18A). Al contrario, en la adipogénesis no se observó modulación de la expresión de los marcadores adipogénicos (Figura 18B).



USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 17. Silenciamiento de NRF1 en C3H10T1/2. Expresión de NRF1 medida mediante RT-PCR a día 0 de diferenciación.

A



USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

B

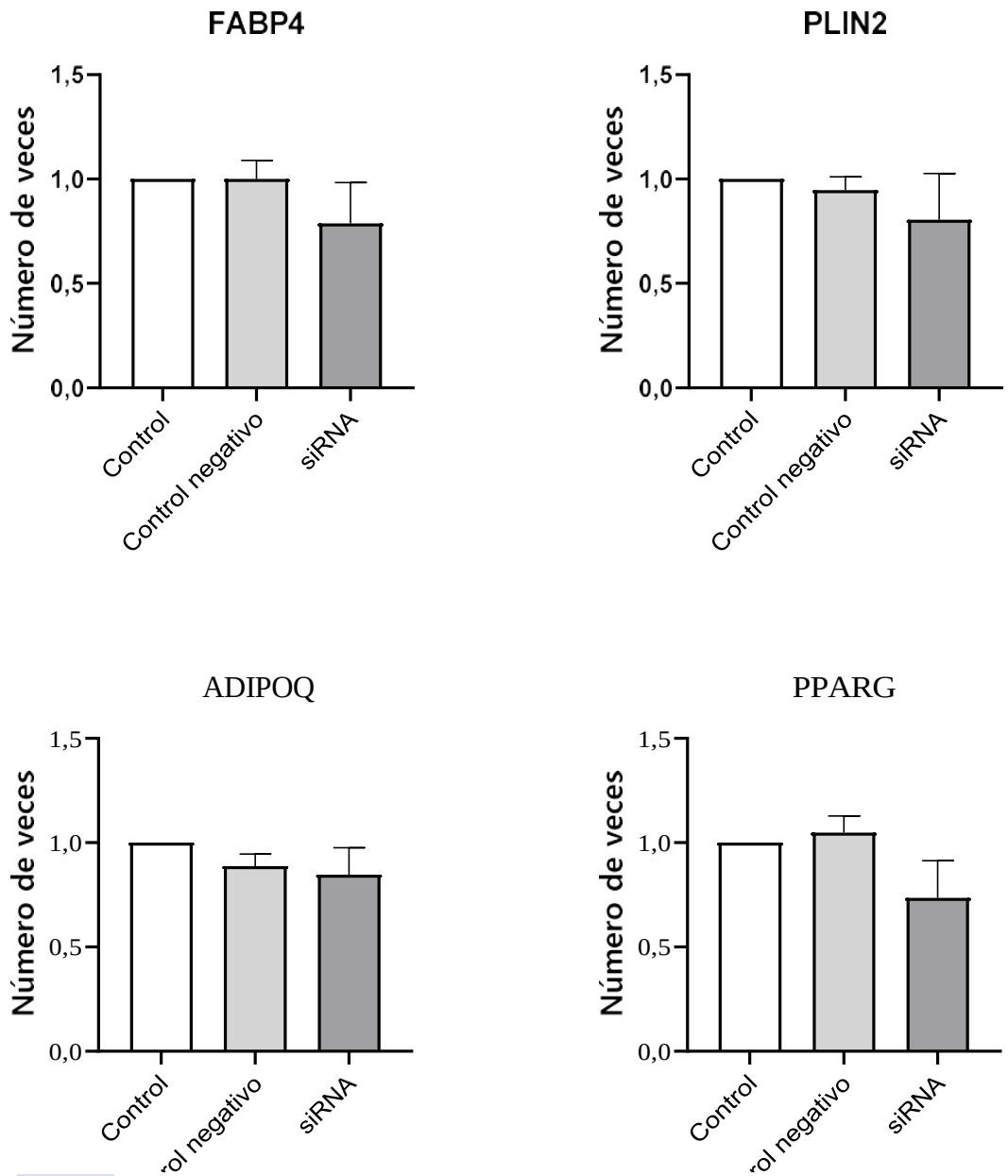


Figura 18. Silenciamiento de NRF1 en C3H10T1/2. A) Expresión de genes marcadores de osteoblastogénesis (ALPL, SPP1, GPNMB y RUNX2) medida mediante RT-PCR en una diferenciación osteoblástica de C3H10T1/2 durante 7 días. B) Expresión de genes marcadores de adipogénesis (FABP4, PLIN2, ADIPOQ y PPARG) medida mediante RT-PCR en una diferenciación adipocítica de C3H10T1/2 durante 7 días. Estadística * respecto al control de diferenciación. Estadística # respecto al control negativo de silenciamiento.

4.2. Silenciamiento de SAP30

Como se observa en la figura 19 el silenciamiento del gen a día 0 fue un 93% eficaz. Los genes osteoblastogénicos no se vieron modificados por el silenciamiento (Figura 20A), y, al igual que con el gen anterior tampoco se modificaron los marcadores durante la adipogénesis (Figura 20B).

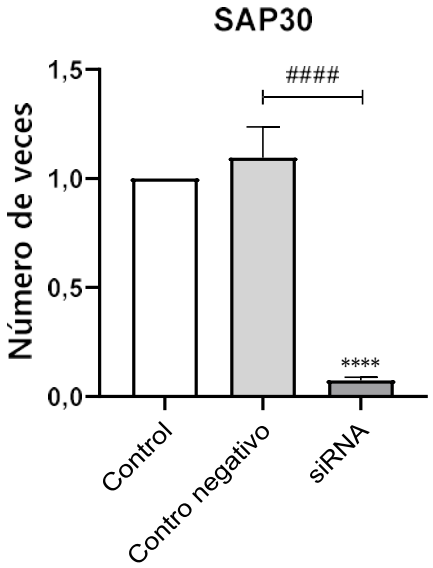
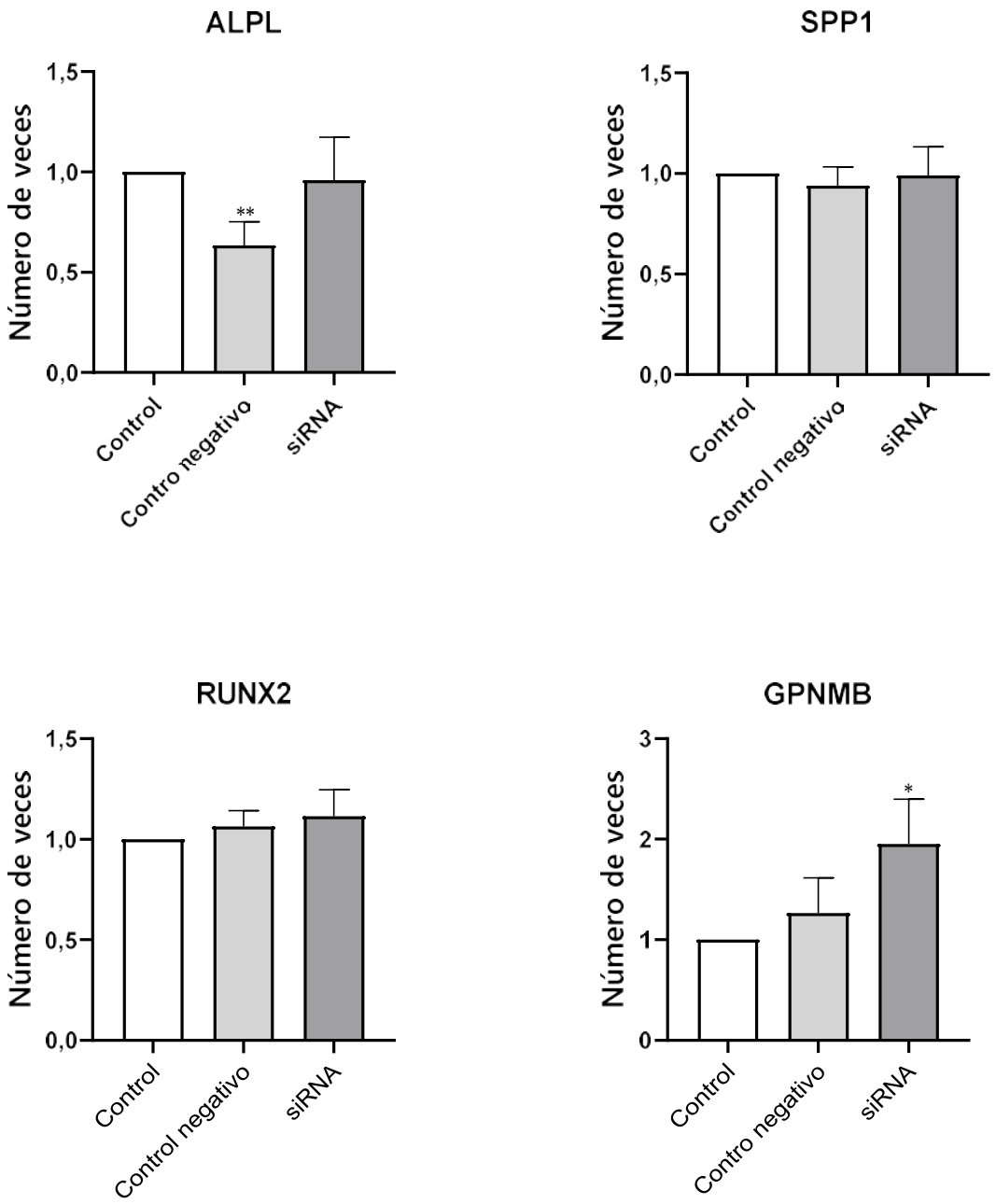


Figura 19. Silenciamiento de SAP30 en C3H10T1/2. Expresión de SAP30 medida mediante RT-PCR a día 0 de diferenciación.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A



USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

B

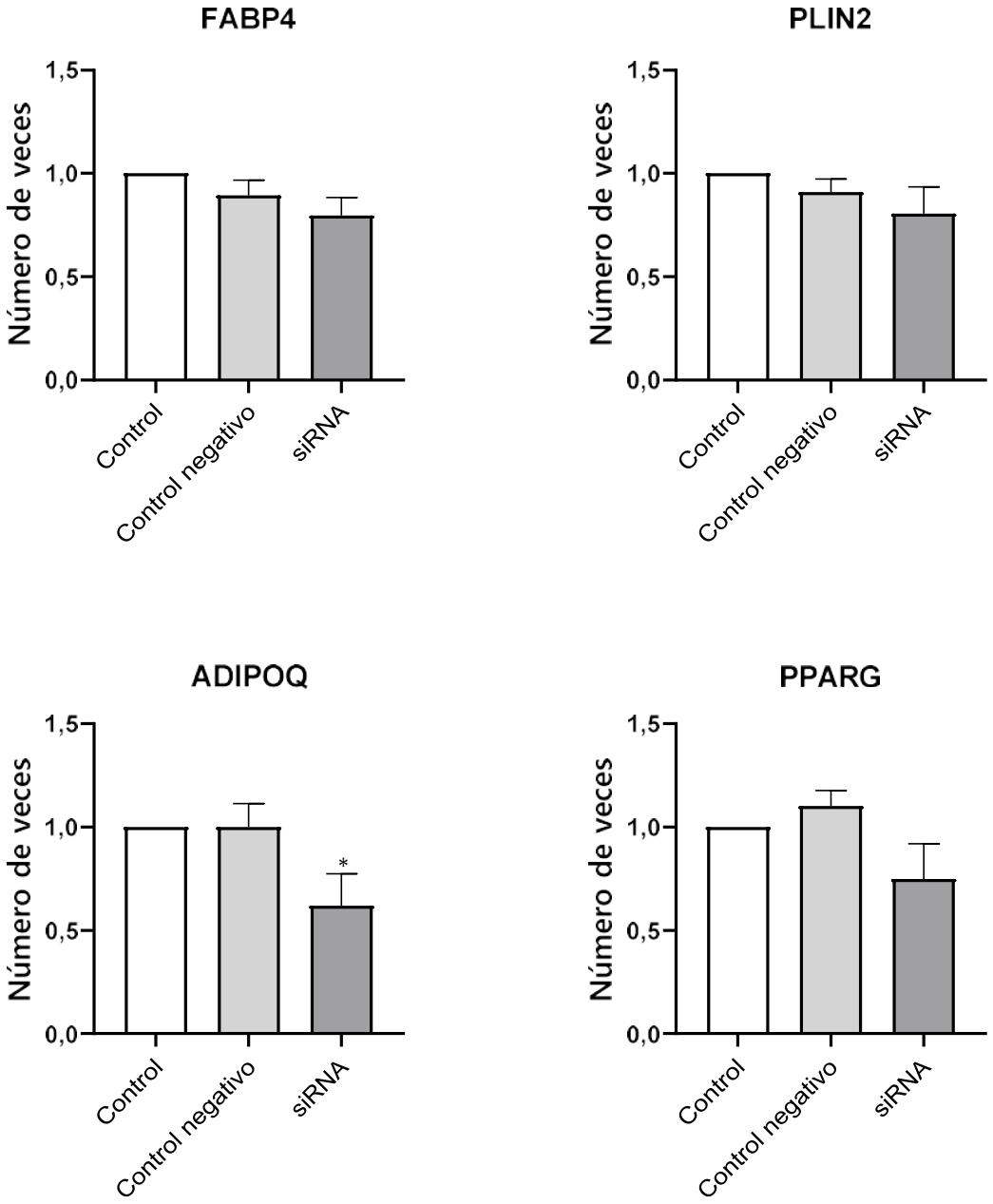


Figura 20. Silenciamiento de SAP30 en C3H10T1/2. A) Expresión de genes marcadores de osteoblastogénesis (ALPL, SPP1, GPNMB y RUNX2) medida mediante RT-PCR en una diferenciación osteoblástica de C3H10T1/2 durante 7 días. B) Expresión de genes marcadores de adipogénesis (FABP4, PLIN2, ADIPOQ y PPARG) medida mediante RT-PCR en una diferenciación adipocítica de C3H10T1/2 durante 7 días. Estadística * respecto al control de diferenciación. Estadística # respecto al control negativo de silenciamiento.

4.3. Silenciamiento de SETDB1

Tras un silenciamiento efectivo (82%) de la expresión de SETDB1 (Figura 21) se vio un aumento de SPP1 durante la osteoblastogénesis (Figura 22A) y disminuyó la expresión de ADIPOQ tras 7 días de adipogénesis (Figura 22B).

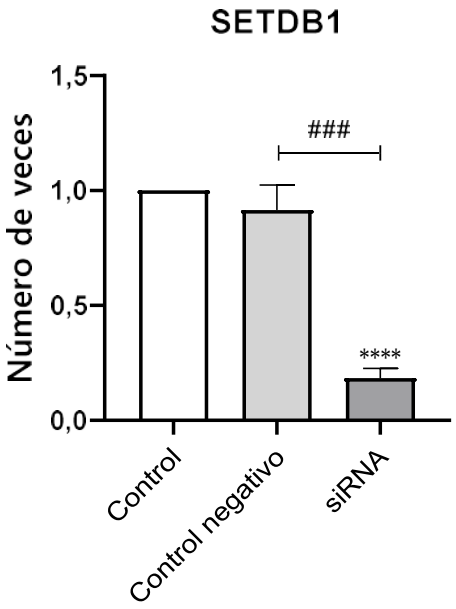
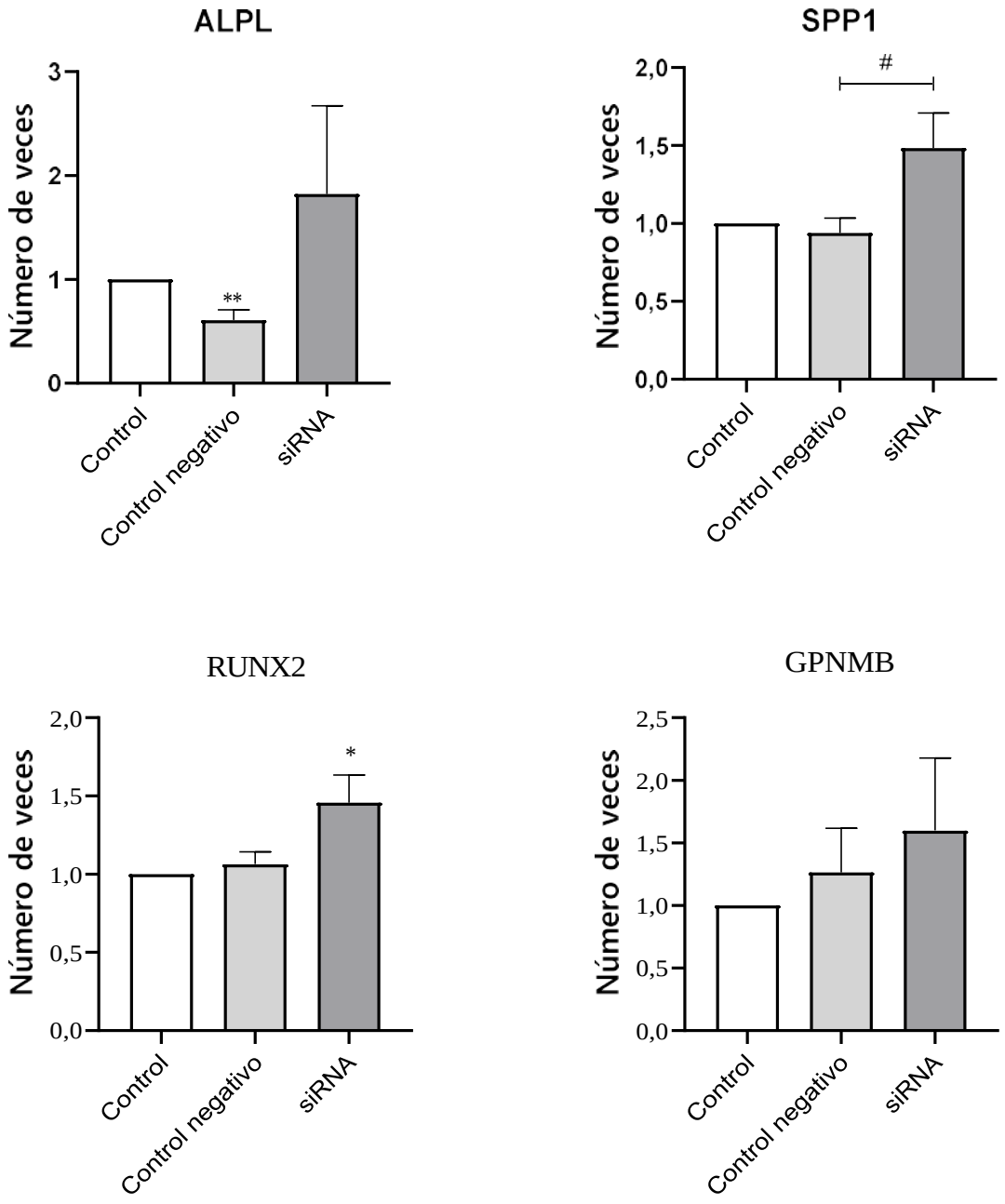


Figura 21. Silenciamiento de SETDB1 en C3H10T1/2. Expresión de SETDB1 medida mediante RT-PCR a día 0 de diferenciación.

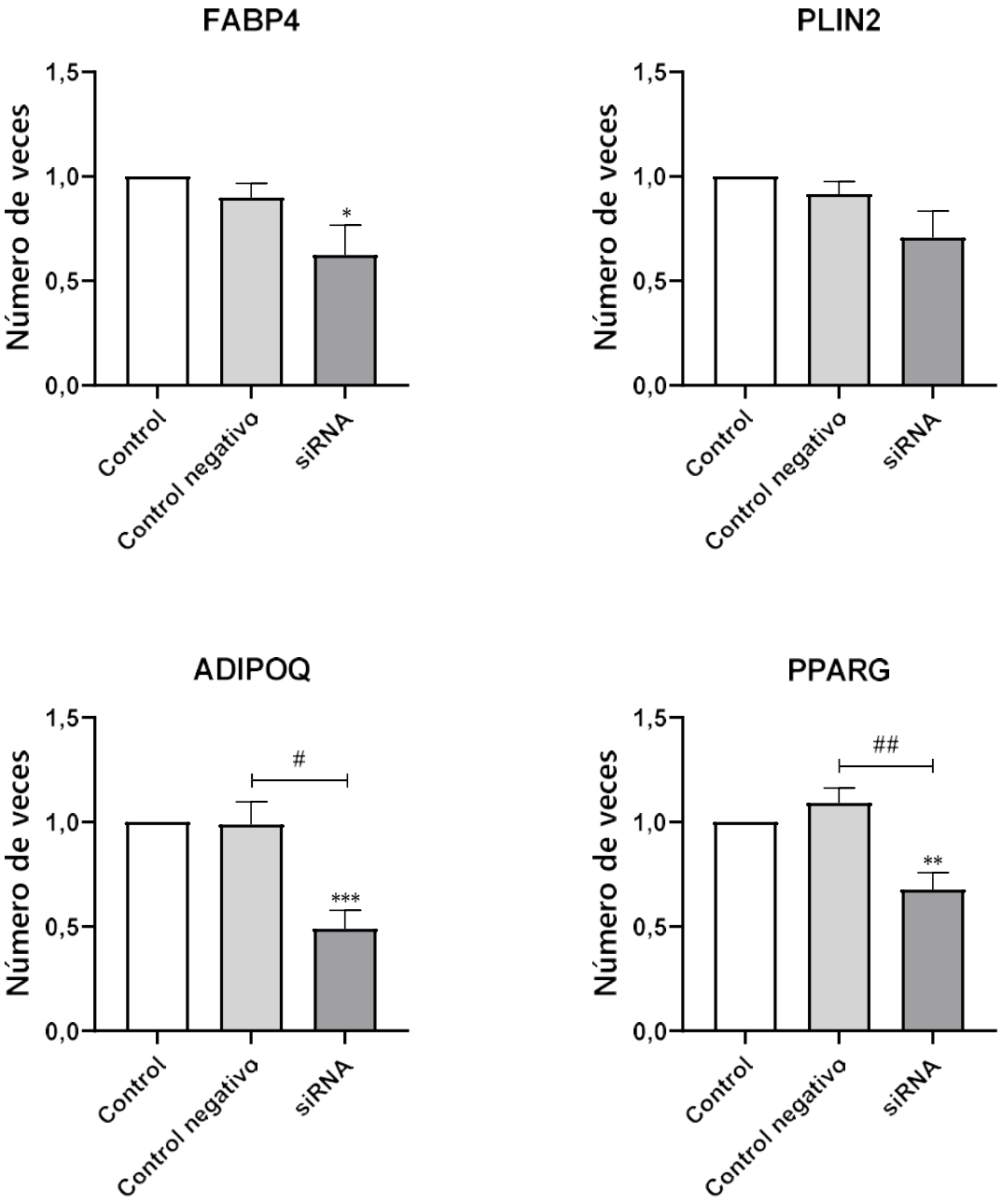
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A



USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

B



USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 22. Silenciamiento de SETDB1 en C3H10T1/2 A) Expresión de genes marcadores de osteoblastogénesis (ALPL, SPP1, GPNMB y RUNX2) medida mediante RT-PCR en una diferenciación osteoblástica de C3H10T1/2 durante 7 días. B) Expresión de genes marcadores de adipogénesis (FABP4, PLIN2, ADIPOQ y PPARG) medida mediante RT-PCR en una diferenciación adipocítica de C3H10T1/2 durante 7 días. Estadística * respecto al control de diferenciación. Estadística # respecto al control negativo de silenciamiento.

4 .4. Silenciamiento de SP4

La expresión de SP4 disminuyó un 72% en el inicio del experimento al realizar la técnica de siRNA (Figura 23). Tras 7 días de diferenciación osteoblástica la expresión de los marcadores osteoblastogénicos no se vio modificada (Figura 24). En la adipogénesis, las expresiones de FABP4, ADIPOQ y PPARG se vieron disminuidas tras el silenciamiento del FTx SP4 (Figura 24B).

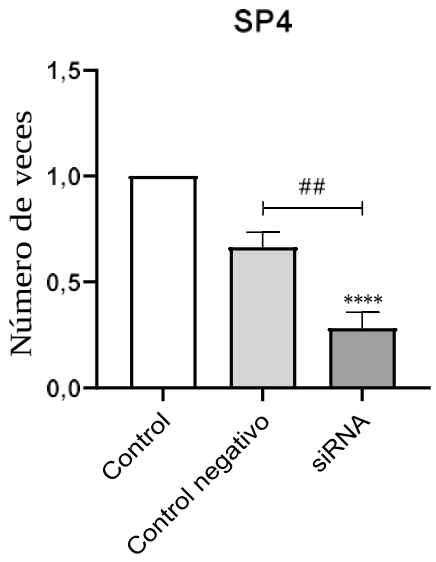
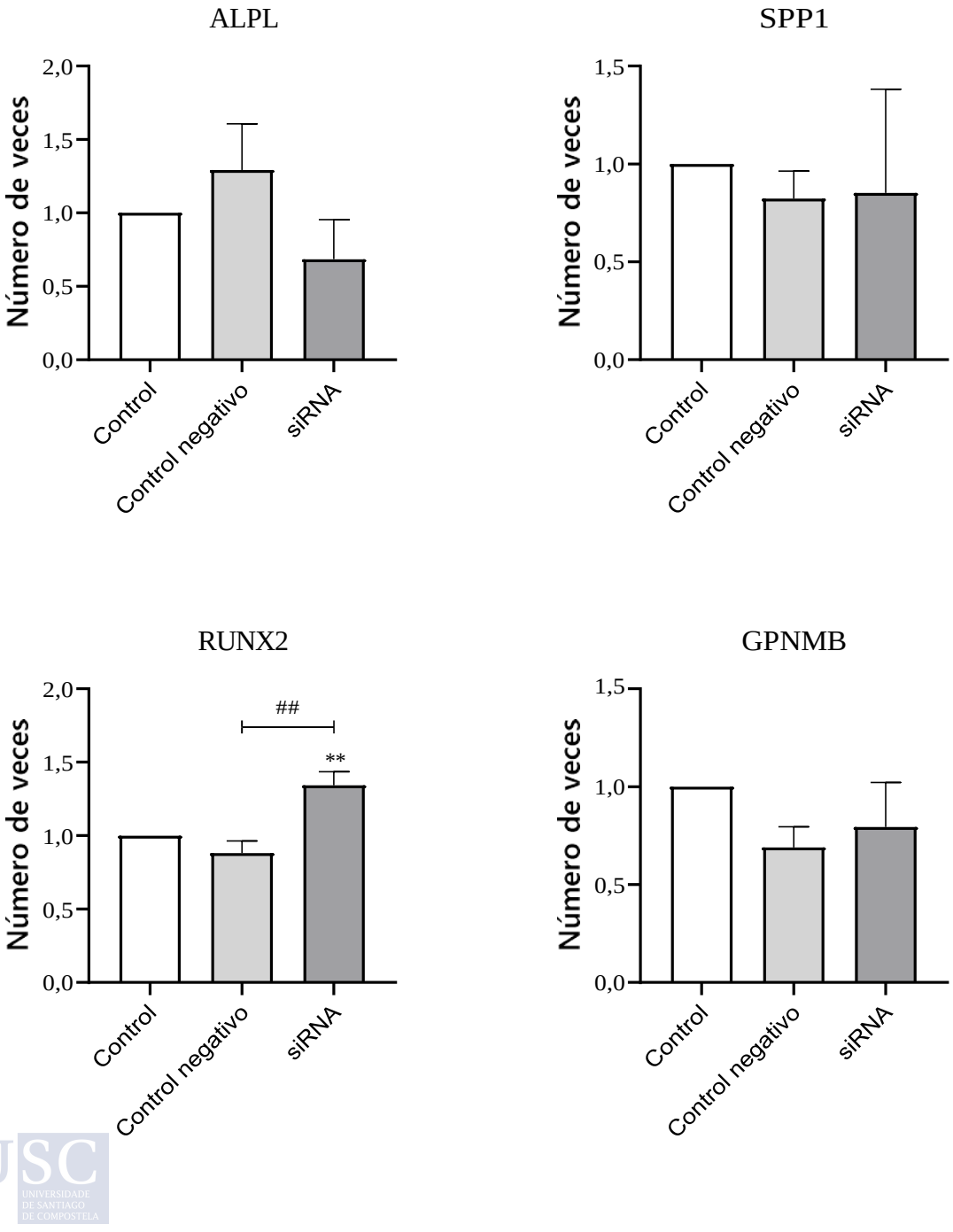


Figura 23. Silenciamiento de SP4 en C3H10T1/2. Expresión de SP4 medida mediante RT-PCR a día 0.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A



USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

B

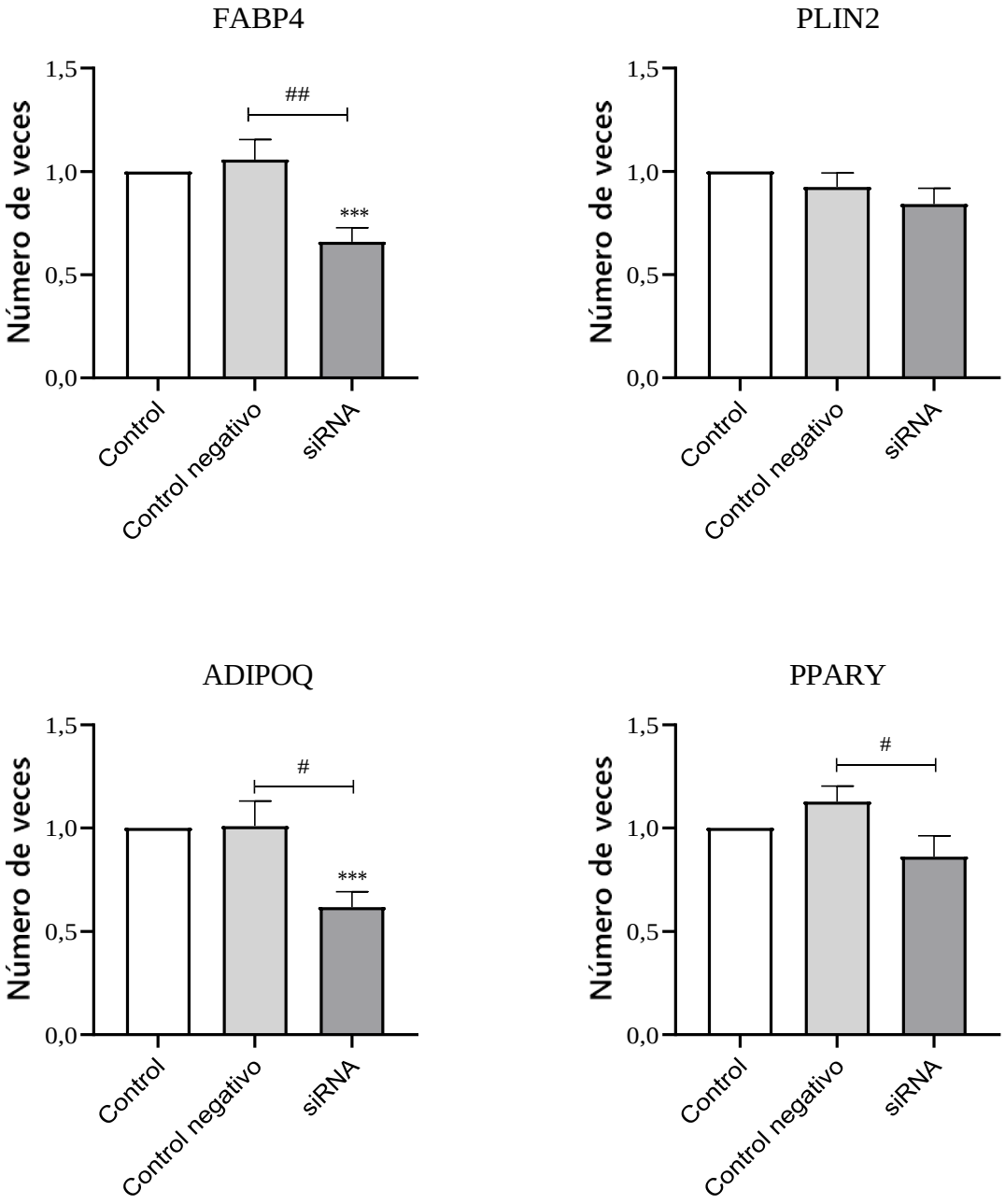


Figura 24. Silenciamiento de SP4 en C3H10T1/2. A) Expresión de genes marcadores de osteoblastogénesis (ALPL, SPP1, GPNMB y RUNX2) medida mediante RT-PCR en una diferenciación osteoblástica de C3H10T1/2 durante 7 días. B) Expresión de genes marcadores de adipogénesis (FABP4, PLIN2, ADIPOQ y PPARG) medida mediante RT-PCR en una diferenciación adipocítica de C3H10T1/2 durante 7 días. Estadística * respecto al control de diferenciación. Estadística # respecto al control negativo de silenciamiento.

4.5. Silenciamiento de SUZ12

En la figura 25 se observa el silenciamiento del gen SUZ12 con una eficacia del 70%. Transcurridos 7 días de osteoblastogénesis se observó un aumento de la expresión de RUNX2 (Figura 26A). Sin embargo, en la diferenciación adipogénica no se observaron diferencias respecto al control (Figura 26B).

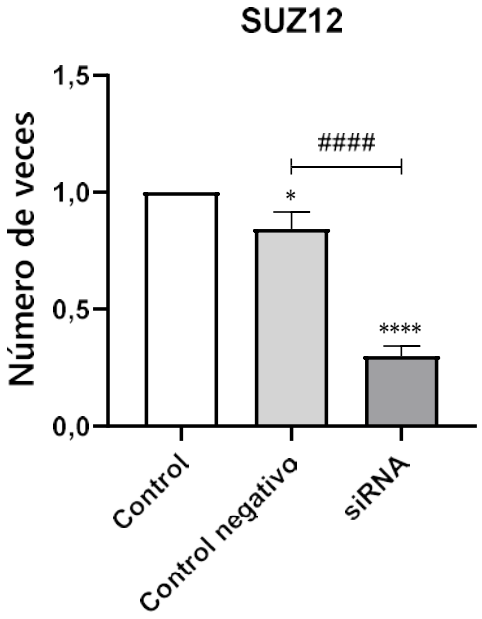
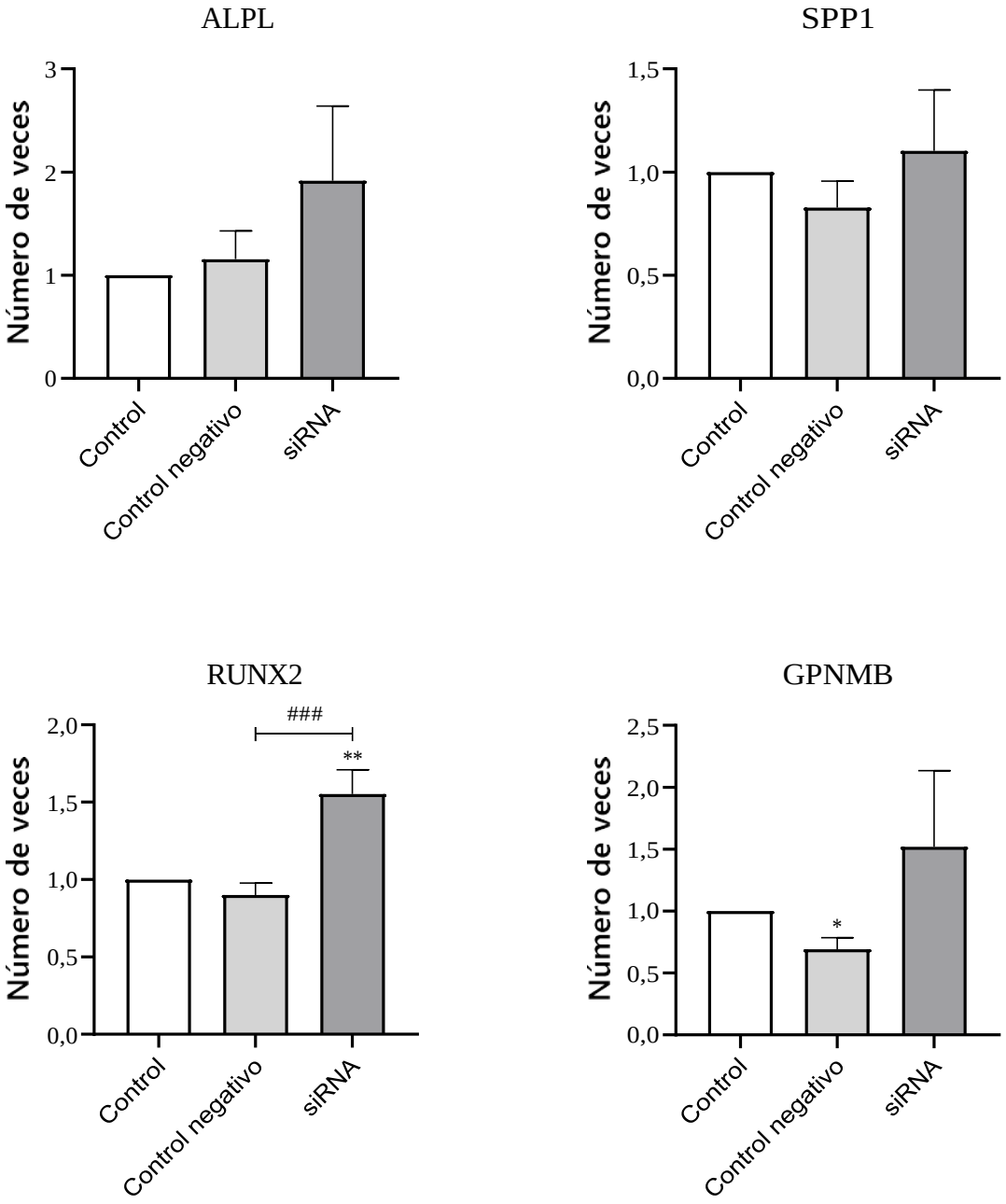


Figura 25. Silenciamiento de SUZ12 en C3H10T1/2. Expresión de SUZ12 medida mediante RT-PCR a día 0 de diferenciación.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A



USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

B

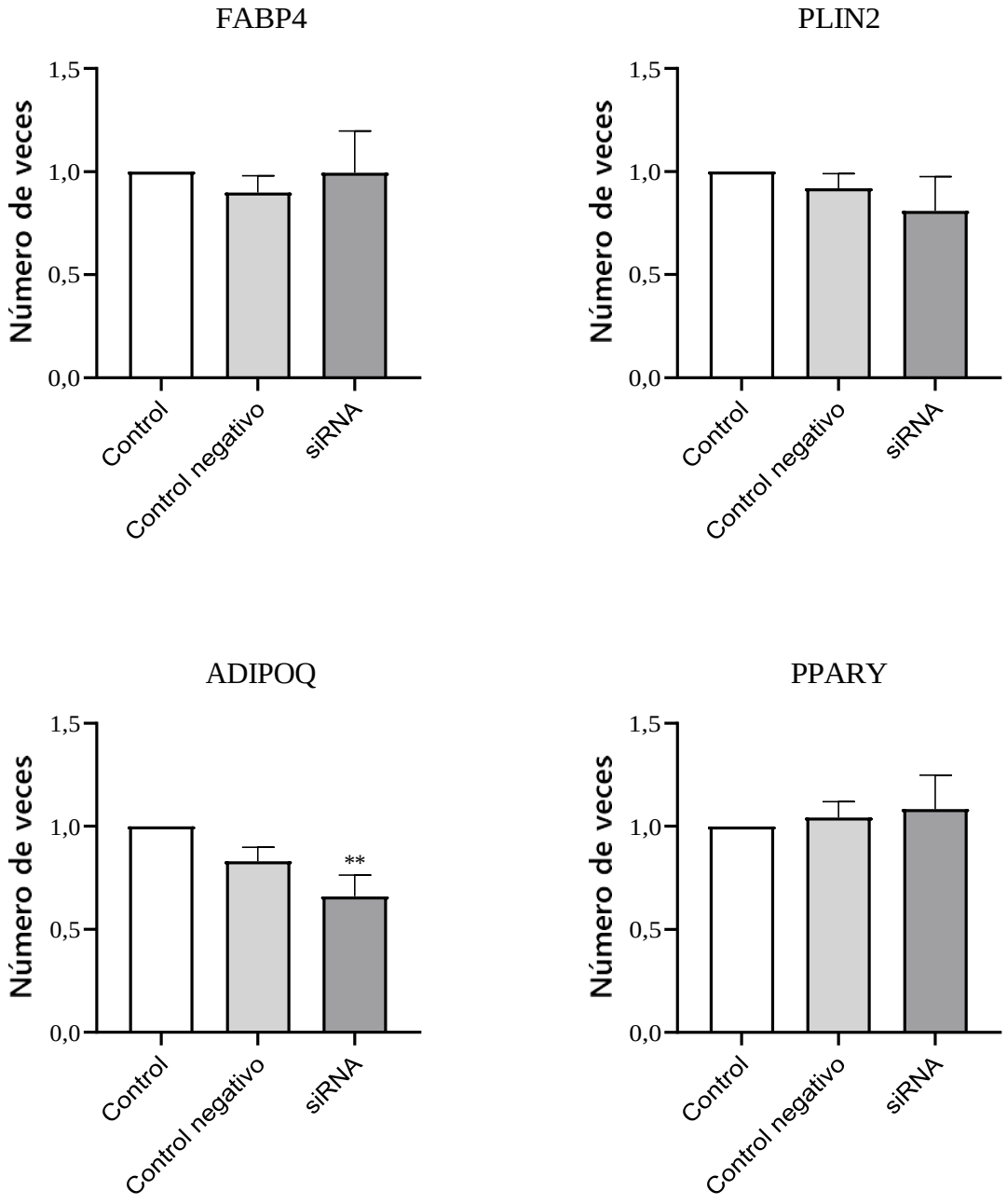


Figura 26. Silenciamiento de SUZ12 en C3H10T1/2. A) Expresión de genes marcadores de osteoblastogénesis (ALPL, SPP1, GPNMB y RUNX2) medida mediante RT-PCR en una diferenciación osteoblástica de C3H10T1/2 durante 7 días. B) Expresión de genes marcadores de adipogénesis (FABP4, PLIN2, ADIPOQ y PPARG) medida mediante RT-PCR en una diferenciación adipocítica de C3H10T1/2 durante 7 días. Estadística * respecto al control de diferenciación. Estadística # respecto al control negativo de silenciamiento.

4.6. Silenciamiento de ZEB1

Una vez confirmado el silenciamiento de la expresión del gen ZEB1 (62%) en el punto inicial del experimento (Figura 27), se determinaron las modificaciones de la expresión de los marcadores osteoblásticos y adipocíticos durante una diferenciación a estos destinos celulares. La expresión de los marcadores génicos de osteoblastogénesis no se vio modificada (Figura 28A). FABP4 y PPARG fueron los marcadores adipogénicos cuya expresión se moduló con el silenciamiento de ZEB1 (Figura 28B).

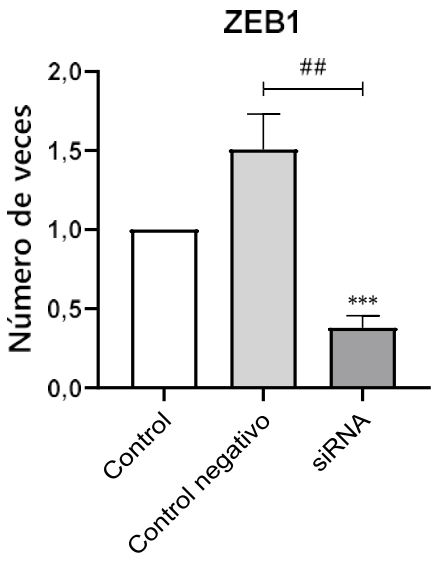
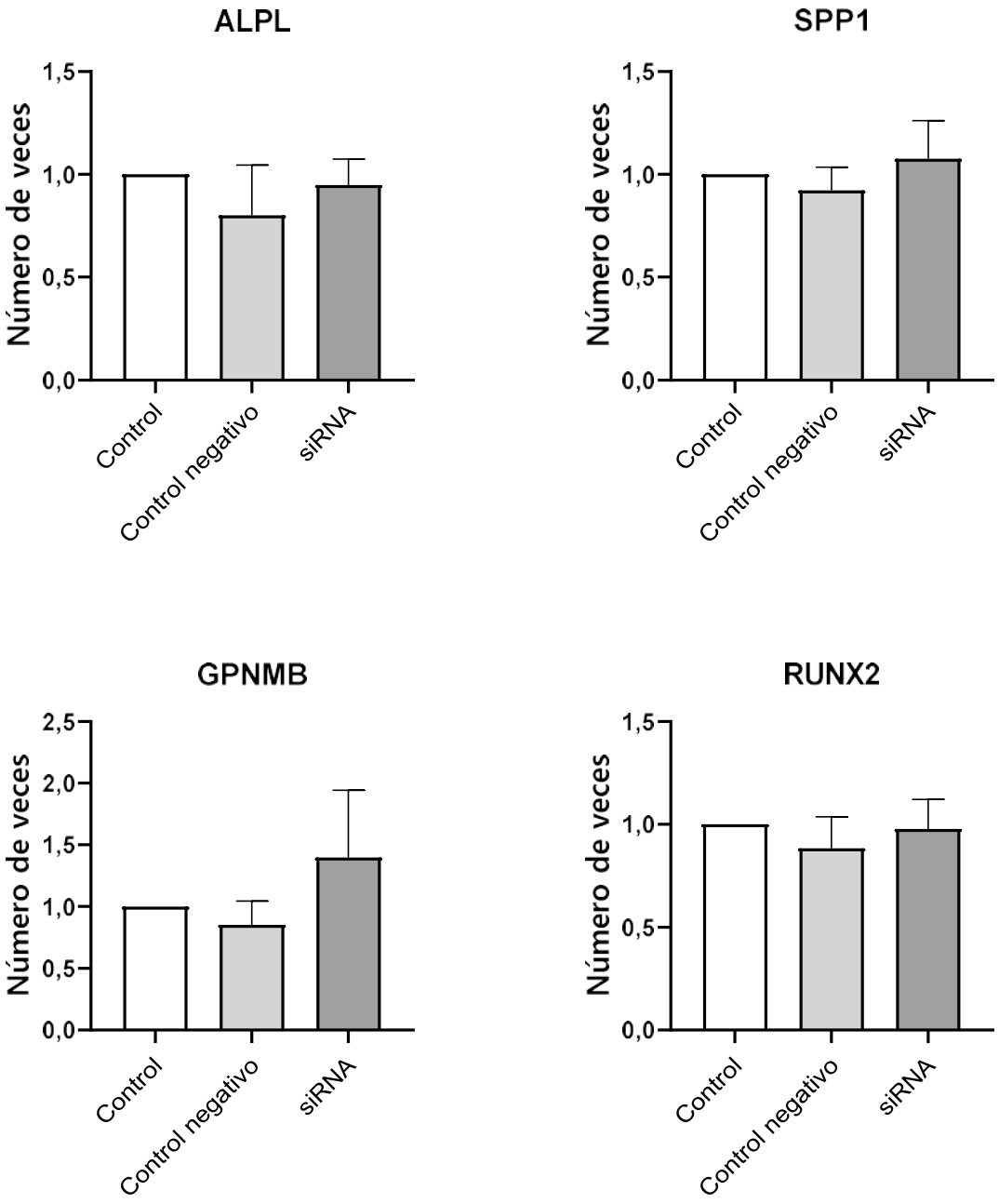


Figura 27. Silenciamiento de ZEB1 en C3H10T1/2. Expresión de ZEB1 medida mediante RT-PCR a día 0 de diferenciación.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A



USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

B

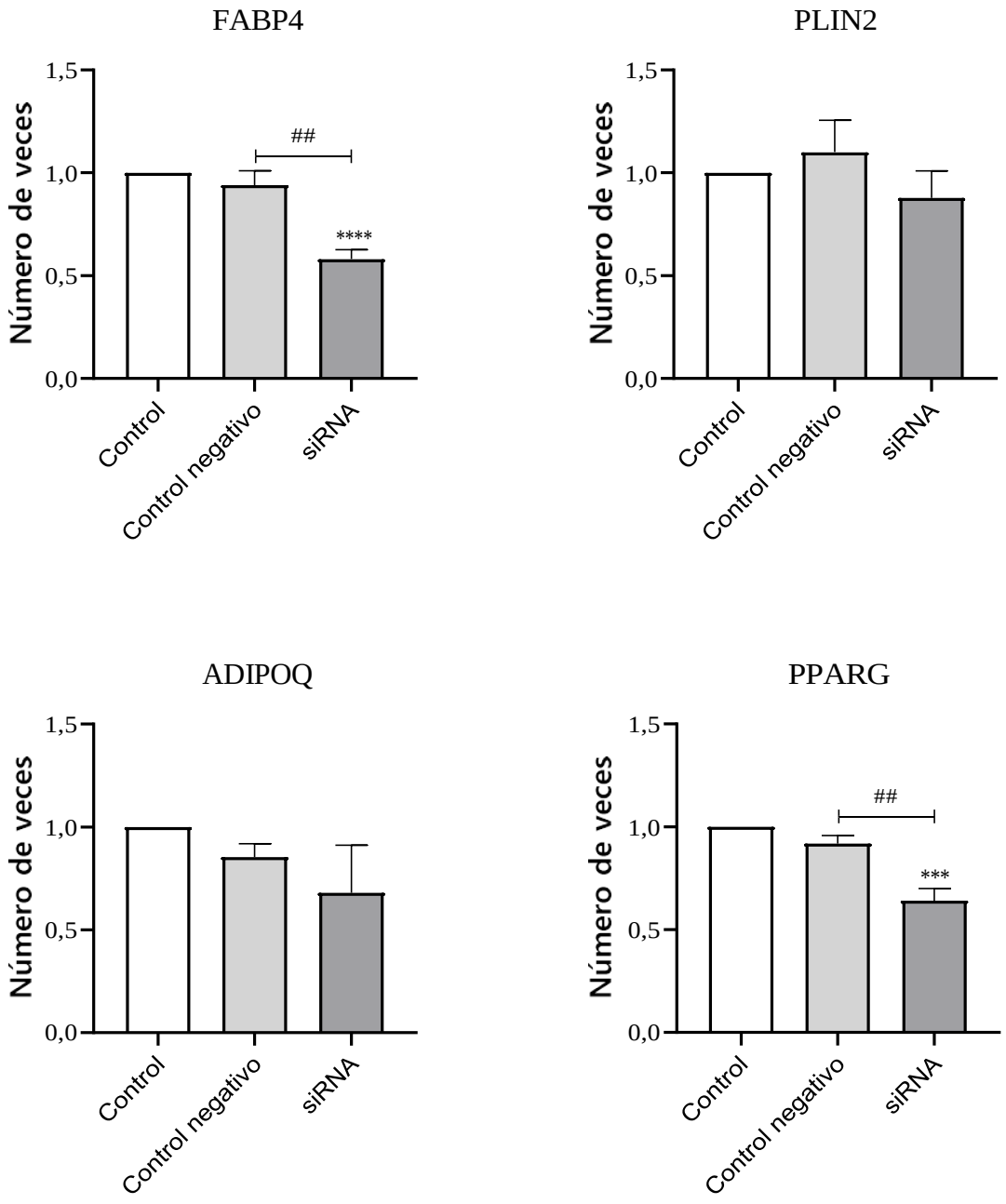


Figura 28. Silenciamiento de ZEB1 en C3H10T1/2. A) Expresión de genes marcadores de osteoblastogénesis (ALPL, SPP1, GPNMB y RUNX2) medida mediante RT-PCR en una diferenciación osteoblástica de C3H10T1/2 durante 7 días. B) Expresión de genes marcadores de adipogénesis (FABP4, PLIN2, ADIPOQ y PPARG) medida mediante RT-PCR en una diferenciación adipocítica de C3H10T1/2 durante 7 días. Estadística * respecto al control de diferenciación. Estadística # respecto al control negativo de silenciamiento.

4.7. Silenciamiento conjunto del nodo

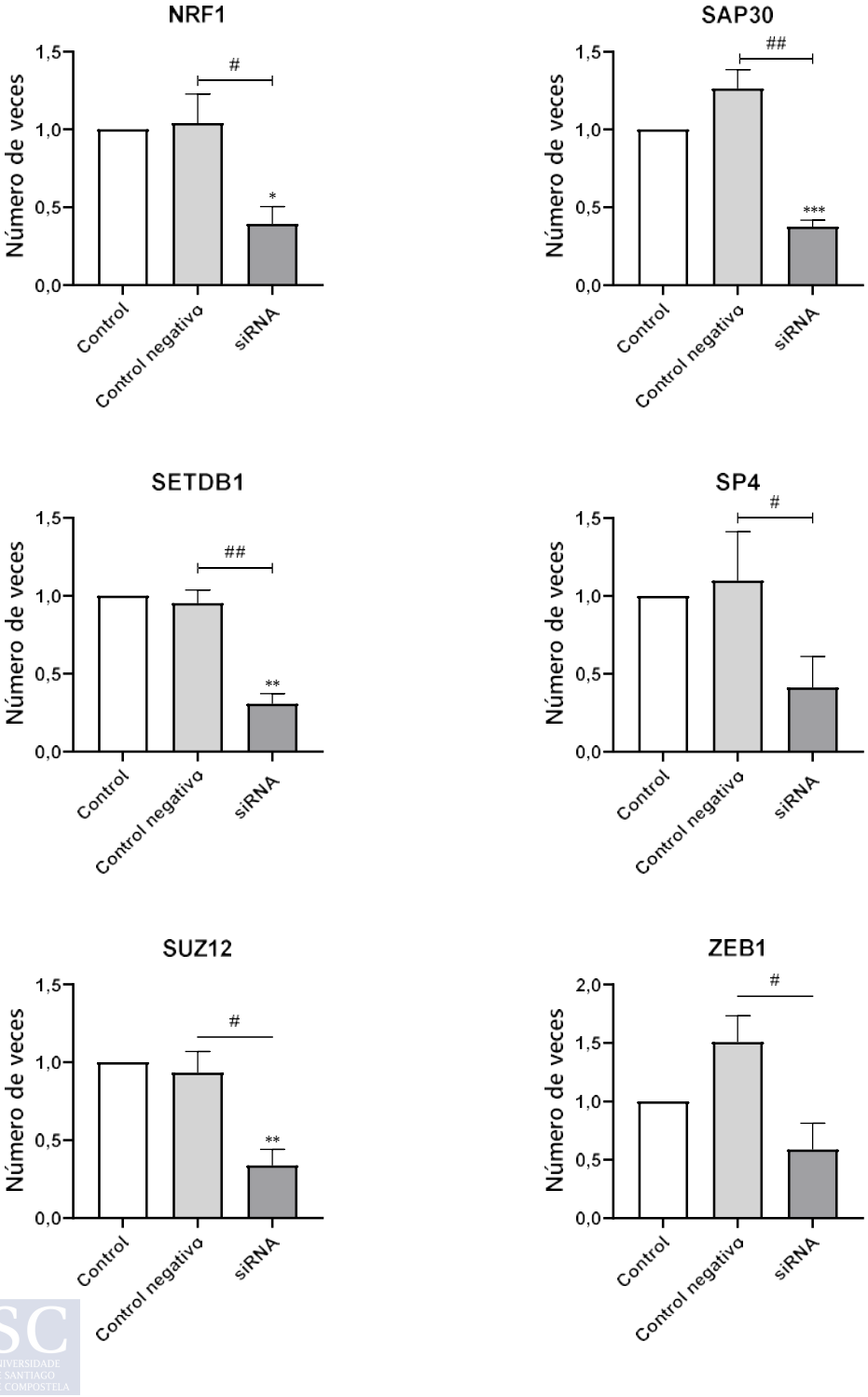
Observando los resultados de los silenciamientos de cada FTx del nodo de forma individual se aprecia una tendencia a aumentar la osteoblastogénesis y a disminuir la adipogénesis en las condiciones silenciadas. No obstante, considerando los resultados de correlación y de diferentes perfiles de expresión obtenidos en las muestras de tejido, buscamos un resultado más robusto de la implicación de estos FTx en la diferenciación de células madre mesenquimales. Sabiendo que los FTx pertenecientes al nodo correlacionan de forma positiva entre ellos, nos planteamos la hipótesis de que pudiesen realizar un trabajo colaborativo entre ellos. Con el fin de determinar esta cooperación, realizamos un silenciamiento conjunto de los FTx del nodo.

En la figura 29 se observa la eficacia del silenciamiento simultáneo de todos los FTx en el punto inicial del experimento (día 0). Aunque la expresión de los genes marcadores de osteoblastogénesis no se vio modificada durante esta diferenciación (Figura 30A) sí que se observó una tendencia al alza en la expresión de todos ellos. En la diferenciación adipogénica disminuyó la expresión de todos los genes marcadores de adipogénesis (FABP4, PLIN2, ADIPOQ, PPARG) (Figura 30B).

A pesar de que los genes estudiados se consideren genes específicos de osteoblastogénesis o adipogénesis, su expresión no se circunscribe únicamente a uno u otro proceso de diferenciación (210,335). Es por eso por lo que, como herramienta de validación, se decidió estudiar también la expresión de los genes marcadores de adipogénesis en las células diferenciadas a osteoblasto (Figura 30C). Interesantemente, en los puntos donde se silenció el nodo, se observó la disminución de la expresión de FABP4 de forma significativa ($p<0,05$) y de ADIPOQ acercándose a la significancia estadística ($p=0,0596$). El hecho de afectar a la expresión de un mismo gen marcador en ambas estirpes celulares sugiere su implicación en la modulación del equilibrio osteoblasto-adipocito.

No solo a nivel genético, el silenciamiento del nodo también afectó a la acumulación celular lipídica evidenciada con rojo de aceite O, reduciéndose de forma dramática en este proceso (Figura 30D). Estos resultados indican la implicación del nodo en la regulación de la adipogénesis, siendo de esta forma

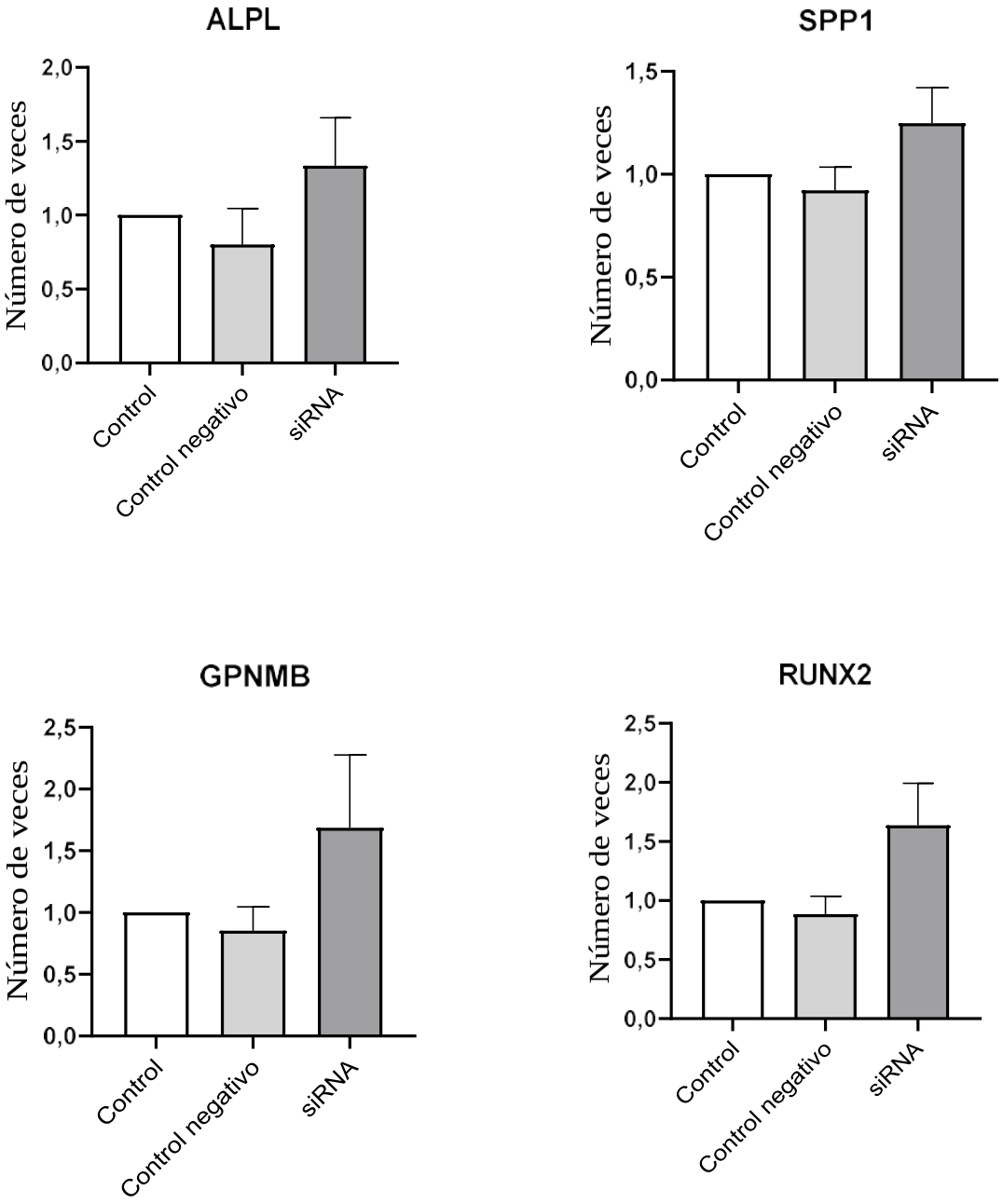
un elemento esencial para la completa diferenciación de células madre mesenquimales a adipocito.



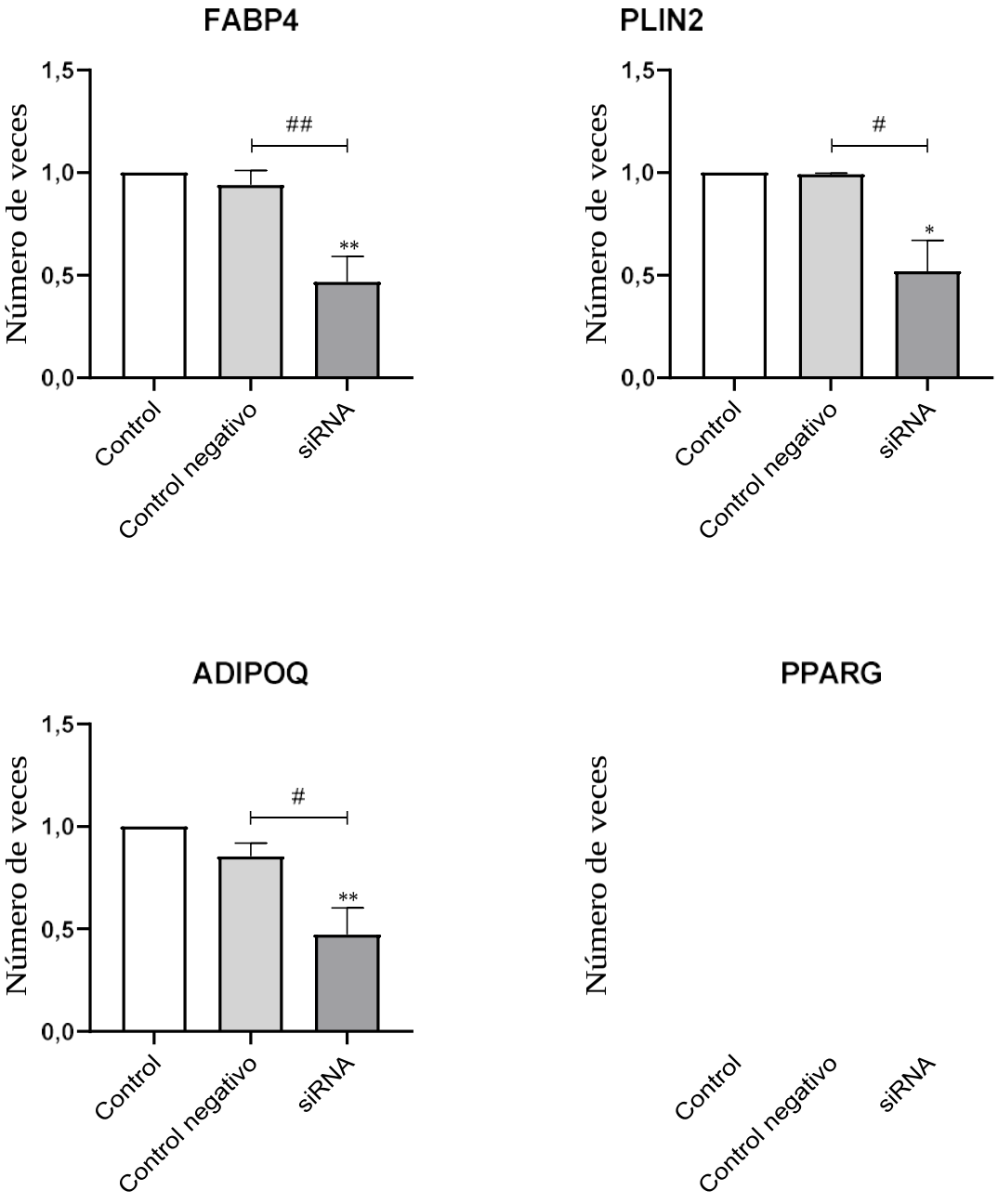
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

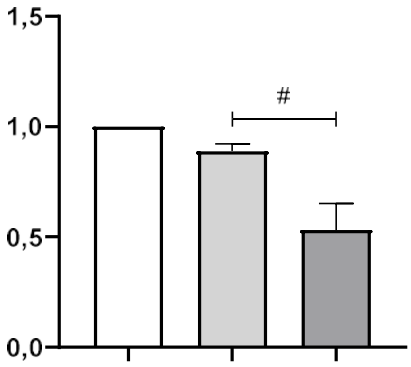
Figura 29. Silenciamiento del nodo en C3H10T1/2. Expresión de los FTx del nodo medida mediante RT-PCR a día 0 de diferenciación.

A


ALPL
Número de veces
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
Control
Control negativo
siRNA
SPP1
Número de veces
1,5
1,0
0,5
0,0
Control
Control negativo
siRNA
GPNMB
Número de veces
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
Control
Control negativo
siRNA
RUNX2
Número de veces
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
Control
Control negativo
siRNA

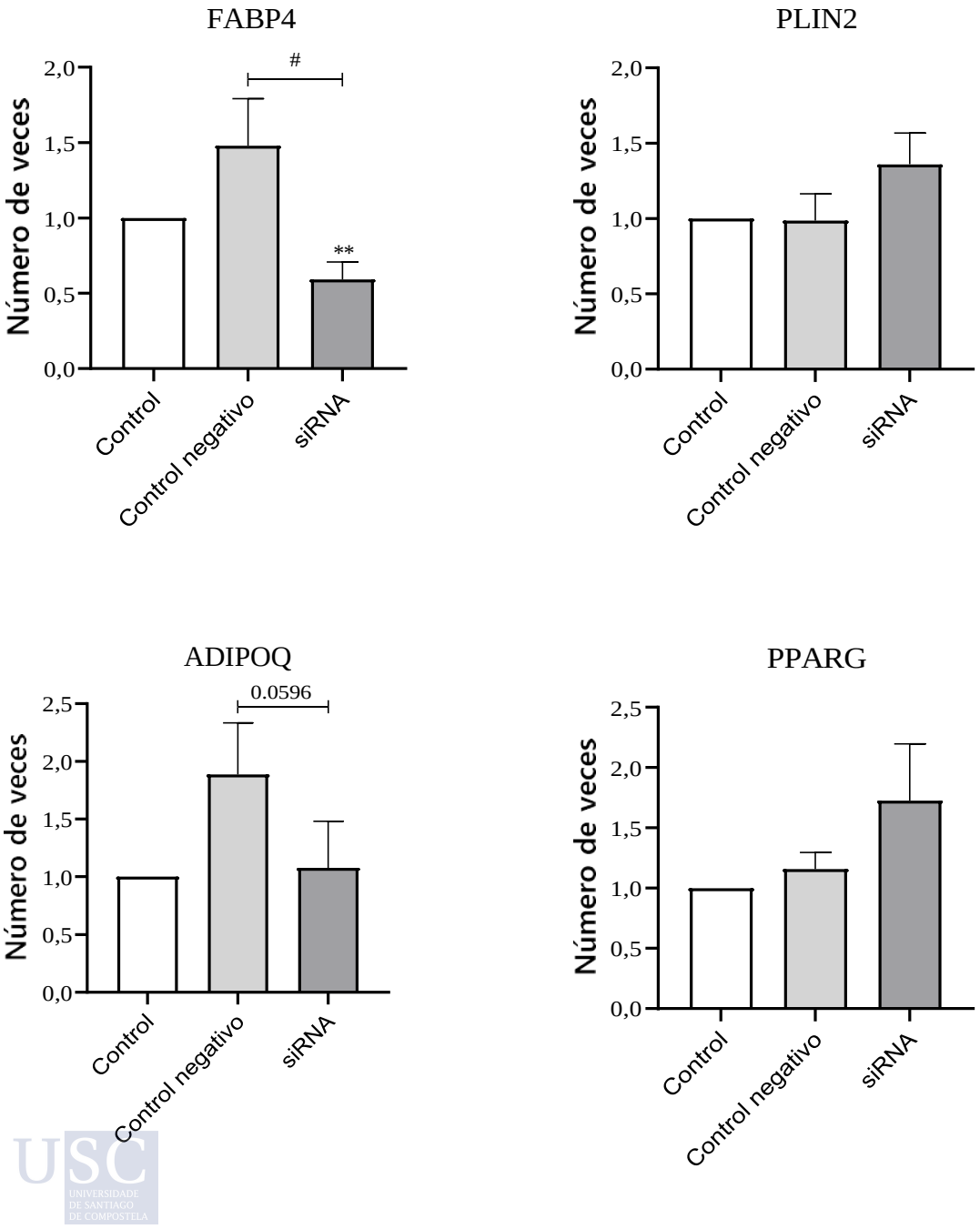
B


FABP4
Número de veces
1,5
1,0
0,5
0,0
##
**
Control
Control negativo
siRNA
PLIN2
Número de veces
1,5
1,0
0,5
0,0
#
*
Control
Control negativo
siRNA
ADIPOQ
Número de veces
1,5
1,0
0,5
0,0
#
**
Control
Control negativo
siRNA
PPARG
Número de veces
Control
Control negativo
siRNA



USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

D



USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

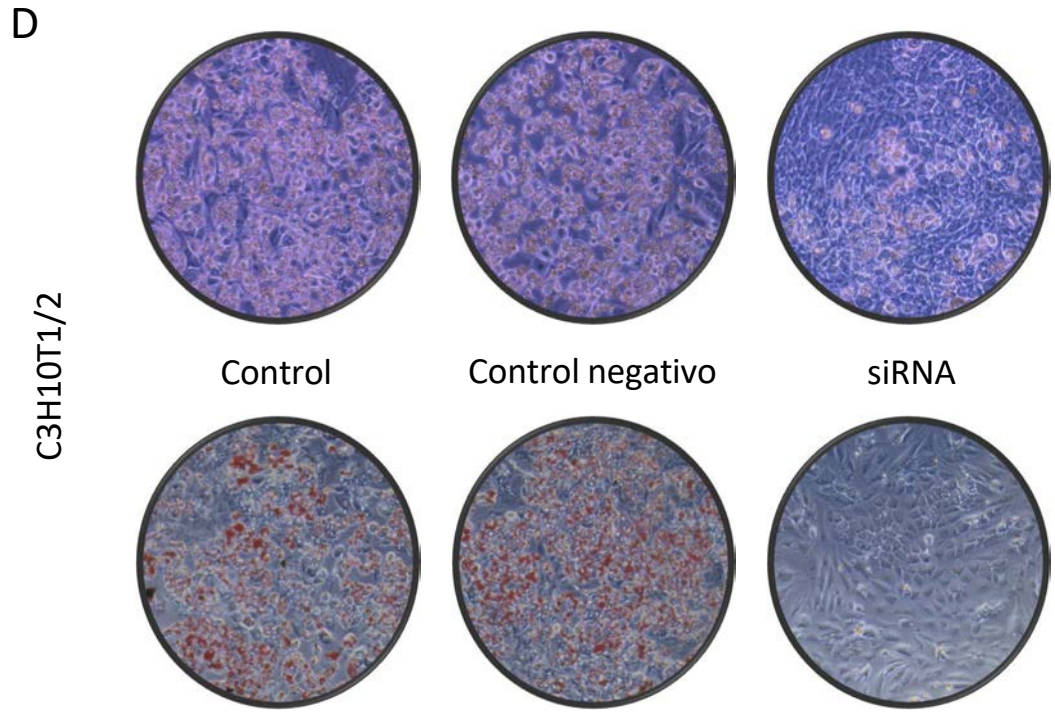


Figura 30. Silenciamiento del nodo en C3H10T1/2. A) Expresión de genes marcadores de osteoblastogénesis (ALPL, SPP1, GPNMB y RUNX2) medida mediante RT-PCR en una diferenciación osteoblástica de C3H10T1/2 durante 7 días. B) Expresión de genes marcadores de adipogénesis (FABP4, PLIN2, ADIPOQ y PPARG) medida mediante RT-PCR en una diferenciación adipocítica de C3H10T1/2 durante 7 días. C) Expresión de genes marcadores de adipogénesis (FABP4, PLIN2, ADIPOQ y PPARG) medida mediante RT-PCR en una diferenciación osteoblástica de C3H10T1/2 durante 7 días. D) Imágenes con aumento 100x tras 7 días de diferenciación adipogénica post-silenciamiento del nodo. Estadística * respecto al control de diferenciación. Estadística # respecto al control negativo de silenciamiento.

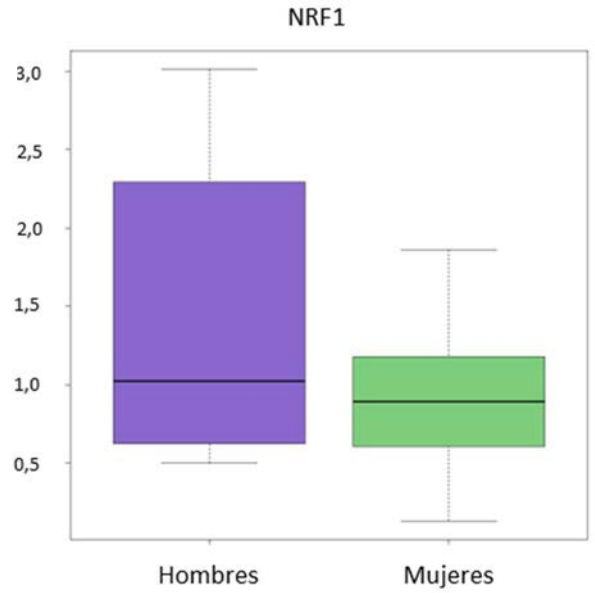
5. Estudio del nodo en un contexto fisiológico y patológico

En vista de los resultados obtenidos acerca de la implicación de los FTx del nodo en la regulación de la adipogénesis y del balance osteoblasto-adipocito, se estudió su expresión en diferentes condiciones fisiopatológicas que puedan afectar o verse afectadas por este equilibrio en muestras de tejido óseo y graso articular. Dentro de las condiciones fisiológicas o no-modulables se evaluaron las diferencias en función del sexo y la edad. Considerando la implicación de la obesidad y de sus comorbilidades en las patologías óseas, alterando los equilibrios necesarios para una correcta calidad ósea se buscó relación entre la expresión de estos FTx y la obesidad (calculada como aumento del índice de masa corporal (IMC)).

5.1. NRF1

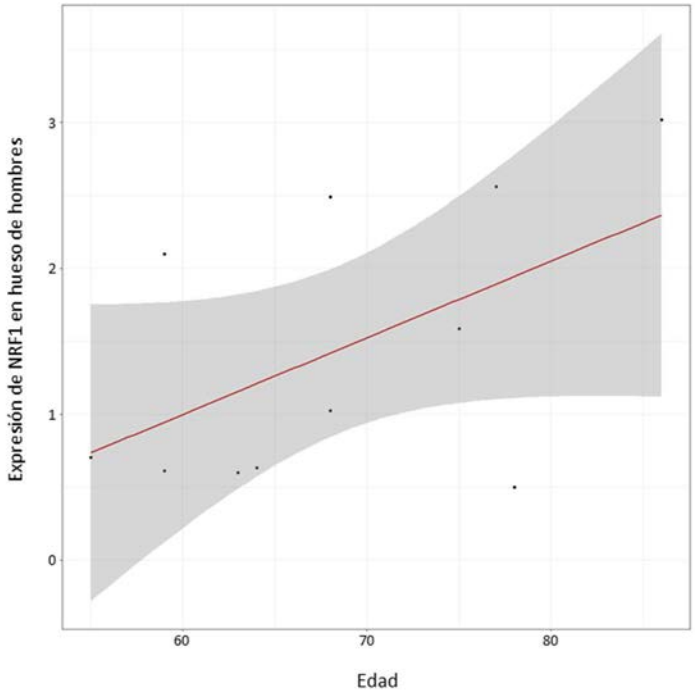
La expresión de NRF1 en hueso articular (cadera y rodilla) no guardó relación con el sexo de los pacientes (Figura 31A). No obstante, cuando estudiamos la correlación entre su expresión y la edad de los pacientes si se observaron divergencias en función del sexo. La expresión de NRF1 en mujeres se mantuvo constante independientemente de la edad (Figura 31B) y correlacionó positivamente (r = 0,5045558) en hombres (Figura 31C) no siendo estadísticamente significativa esta correlación. La correlación entre la expresión de NRF1 y el aumento del IMC no tuvo un coeficiente de correlación alto ni suficiente potencia estadística (Figura 31D).

A



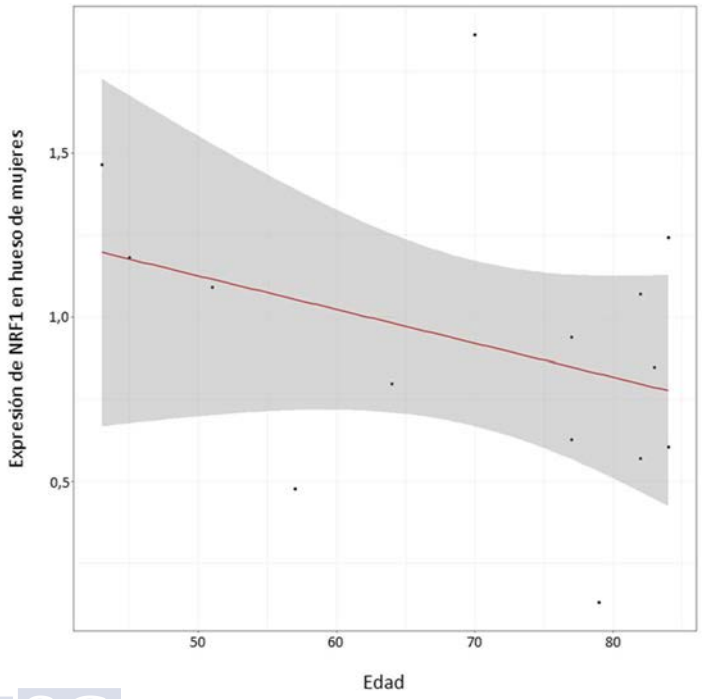
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

B



Valor de p	r	Tipo de test
0,2823	0,3561681	Spearman
0,152	0,4625856	Pearson

C



Valor de p	r	Tipo de test
0,2976	-0,299989	Spearman
0,2751	-0,313458	Pearson

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

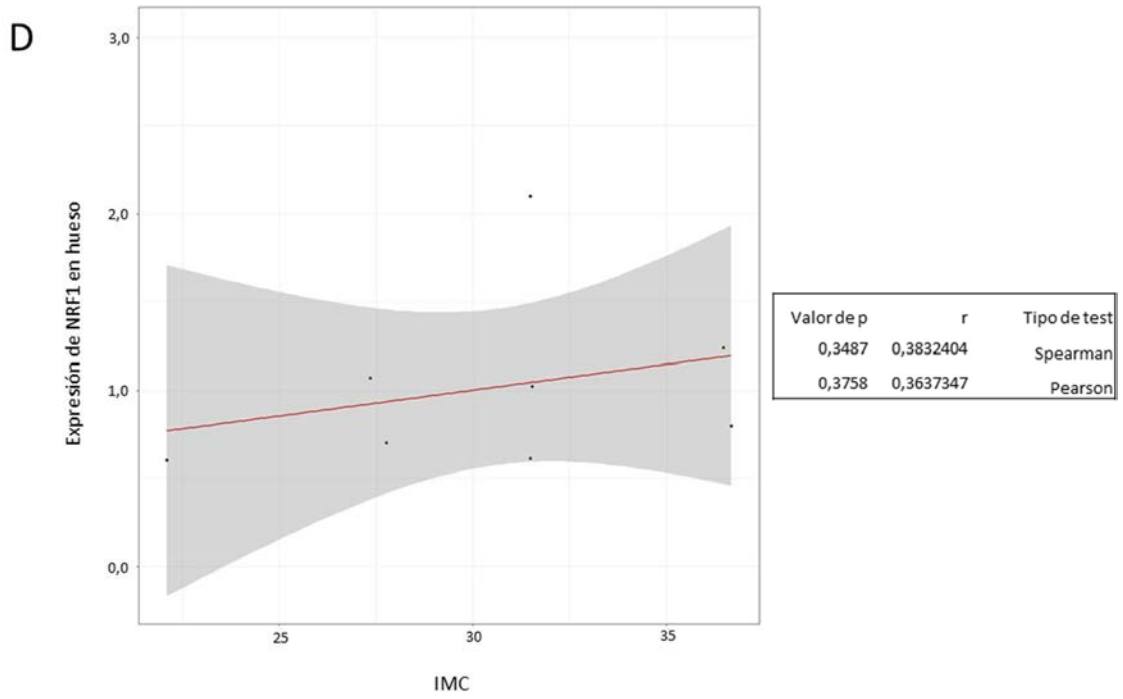


Figura 31. Expresión de NRF1 en hueso en diferentes condiciones fisiopatológicas. A) Expresión de NRF1 en hueso de hombres y mujeres medida por RT-PCR. B) Correlación de la expresión de NRF1 en hueso con la edad en hombres. C) Correlación de la expresión de NRF1 en hueso con la edad en mujeres. D) Correlación de la expresión de NRF1 con el IMC.

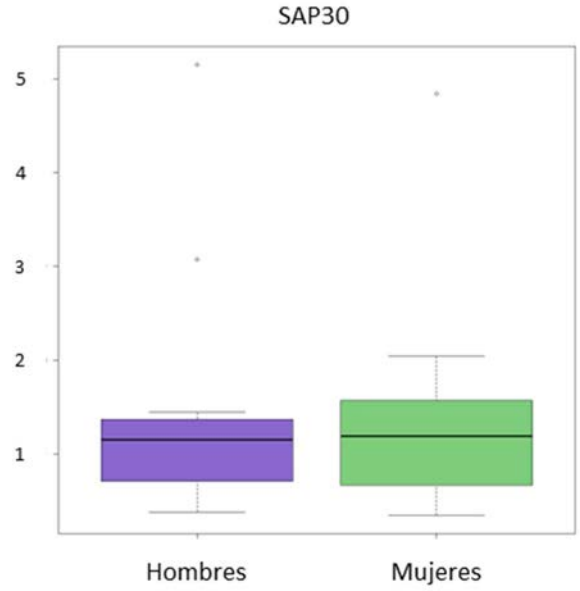
5.2. SAP30

SAP30 es un FTx cuya expresión se mantuvo constante en hueso articular independientemente del sexo y la edad de los pacientes (Figura 32A-C). Se apreció una ligera correlación negativa con la edad en mujeres que no se observó en hombres, aunque el coeficiente de correlación no fue destacable.

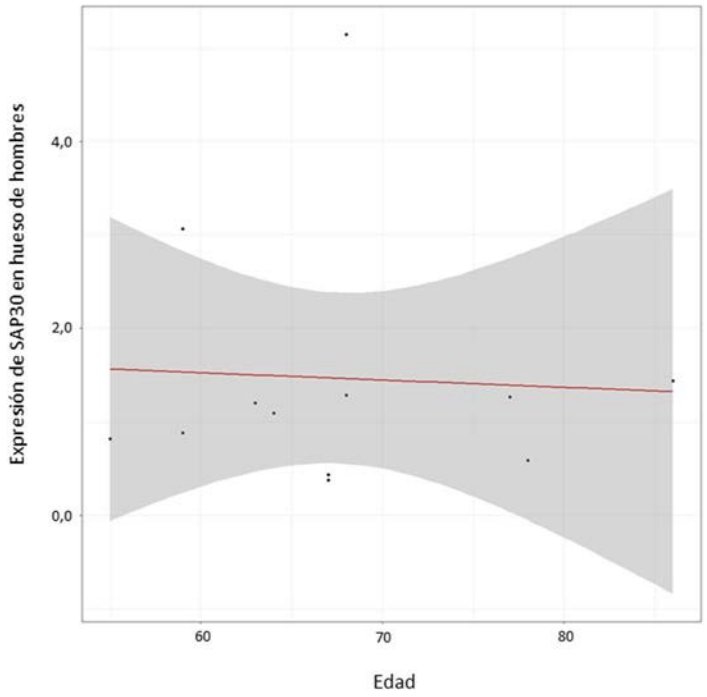
Interesantemente, respecto a la obesidad, el aumento del IMC correlacionó (r = 0,5775103) con la expresión de SAP30 (Figura 32D) pero no presentó una potencia significativa suficiente.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A



B



Valor de p	r	Tipo de test
0,5696	0,1827793	Spearman
0,9351	-0,02638	Pearson

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

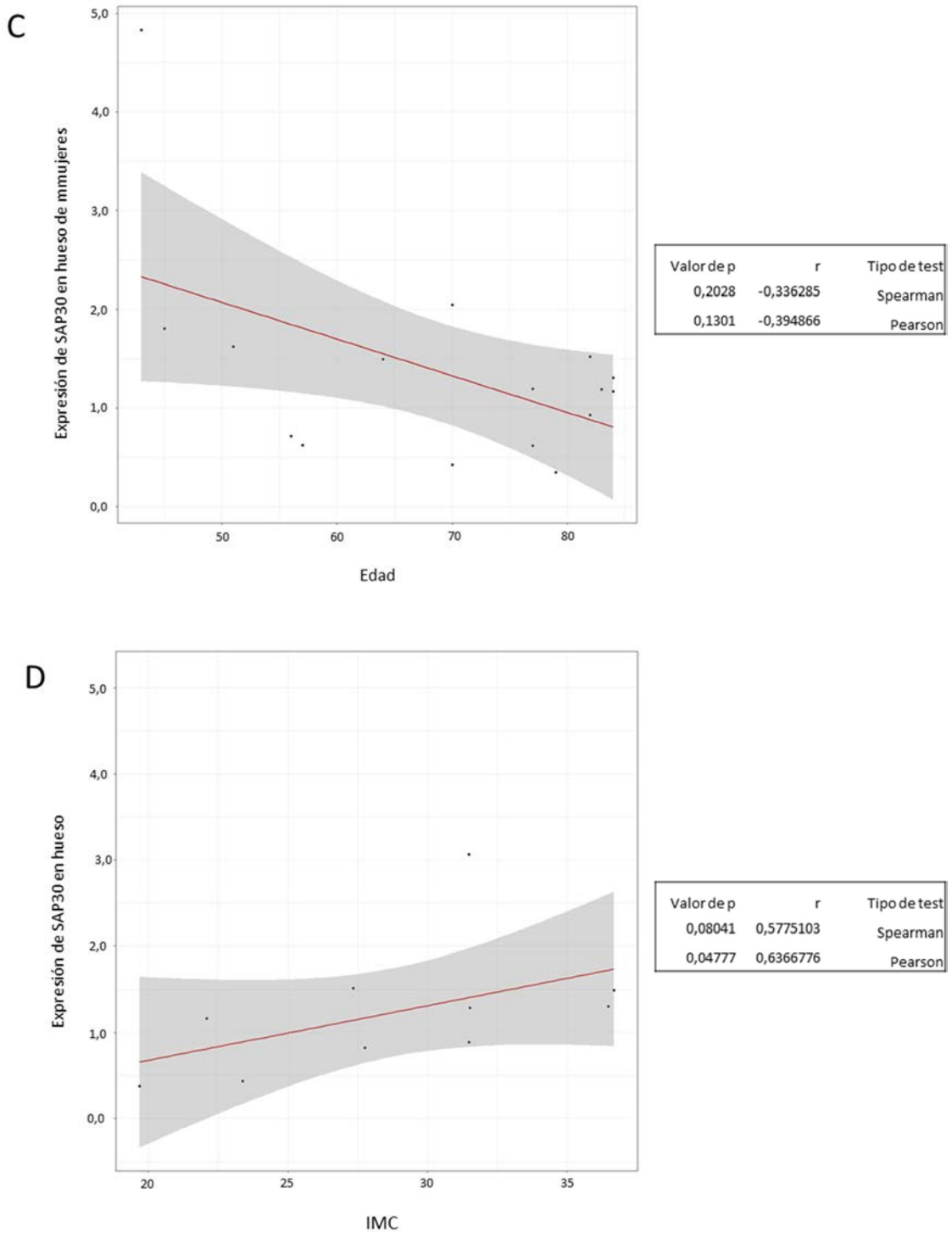


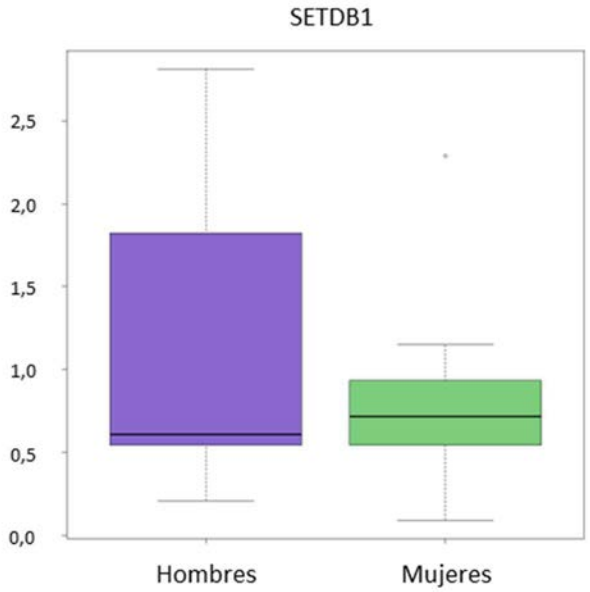
Figura 32. Expresión de SAP30 en hueso en diferentes condiciones fisiopatológicas. A) Expresión de SAP30 en hueso de hombres y mujeres medida por RT-PCR. B) Correlación de la expresión de SAP30 en hueso con la edad en hombres. C) Correlación de la expresión de SAP30 en hueso con la edad en mujeres. D) Correlación de la expresión de SAP30 con el IMC.

5.3. SETDB1

No se evidenciaron diferencias en la expresión de SETDB1 en hueso articular en lo que a sexo se refiere (Figura 33A). Si existían, al contrario, diferencias en su correlación con la edad al separar entre hombres y mujeres (Figura 33B-C). Aunque la magnitud de la correlación no fue la suficiente, si existía diferencia en su signo, negativo en el caso de las mujeres y positivo en el caso de los hombres.

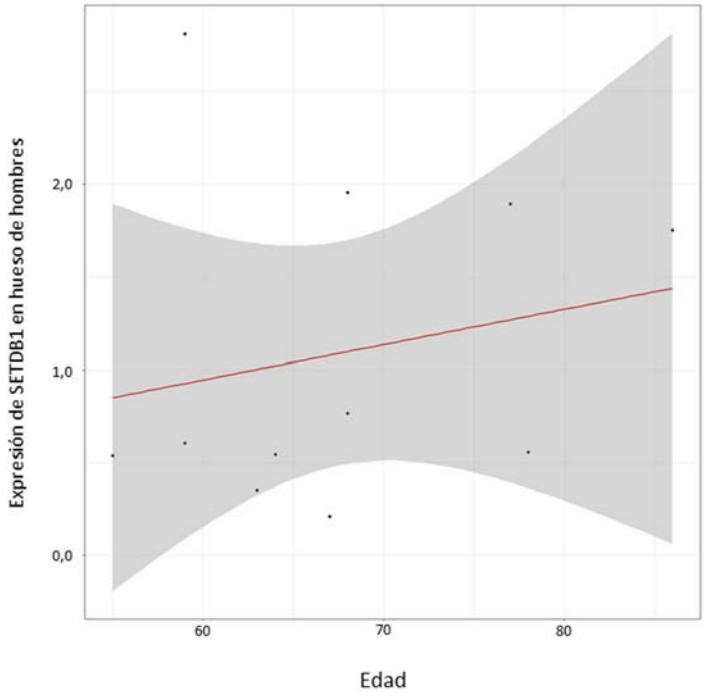
En lo que al aumento de IMC se refiere, la expresión de SETDB1 en las muestras óseas correlacionó fuerte ($r = 0,6861985$) y significativamente ($p<0,05$) con esta variable, confirmando así su relación con la obesidad (Figura 33D).

A



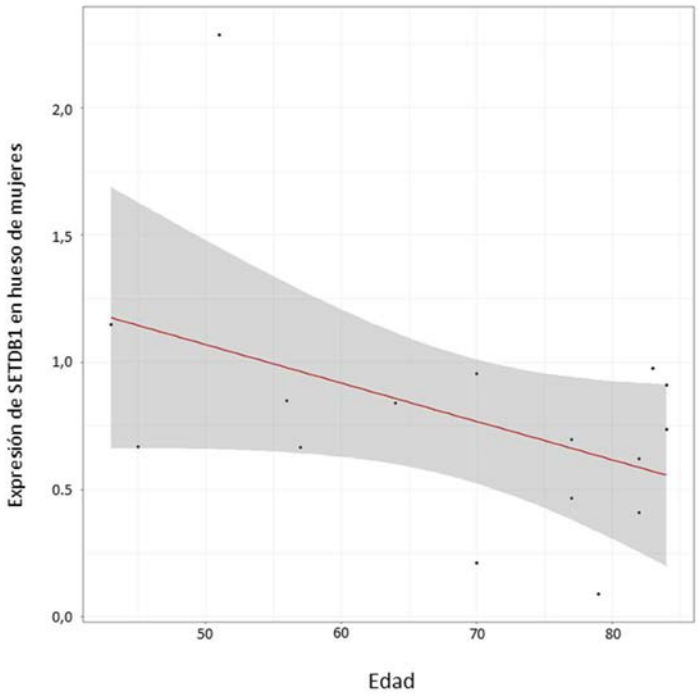
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

B



Valor de p	r	Tipo de test
0,4149	0,2739755	Spearman
0,401	0,2819007	Pearson

C



Valor de p	r	Tipo de test
0,3431	-0,2536884	Spearman
0,1485	-0,37831	Pearson

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

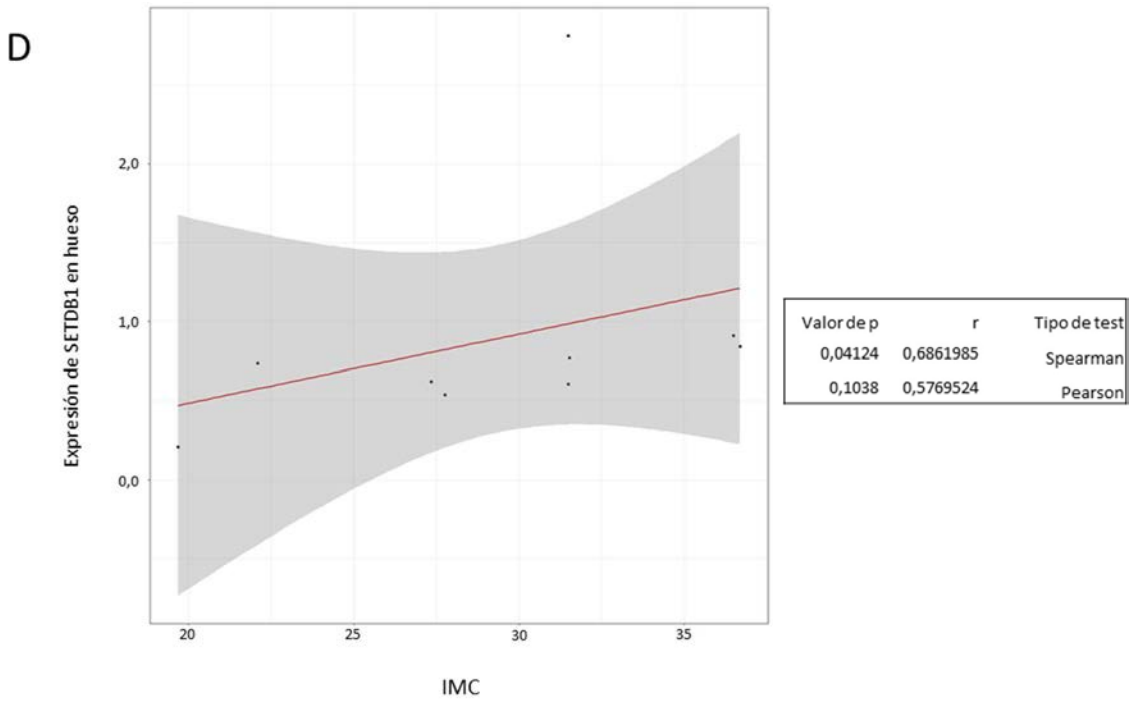


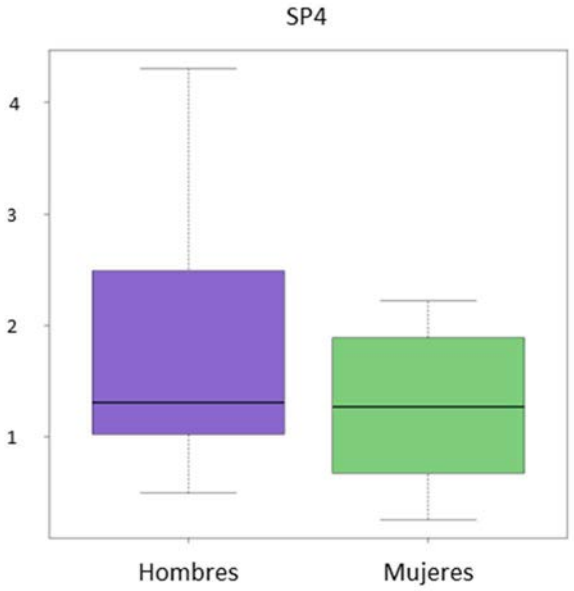
Figura 33. Expresión de SETDB1 en hueso en diferentes condiciones fisiopatológicas. A) Expresión de SETDB1 en hueso de hombres y mujeres medida por RT-PCR. B) Correlación de la expresión de SETDB1 en hueso con la edad en hombres. C) Correlación de la expresión de SETDB1 en hueso con la edad en mujeres. D) Correlación de la expresión de SETDB1 con el IMC.

5.4. SP4

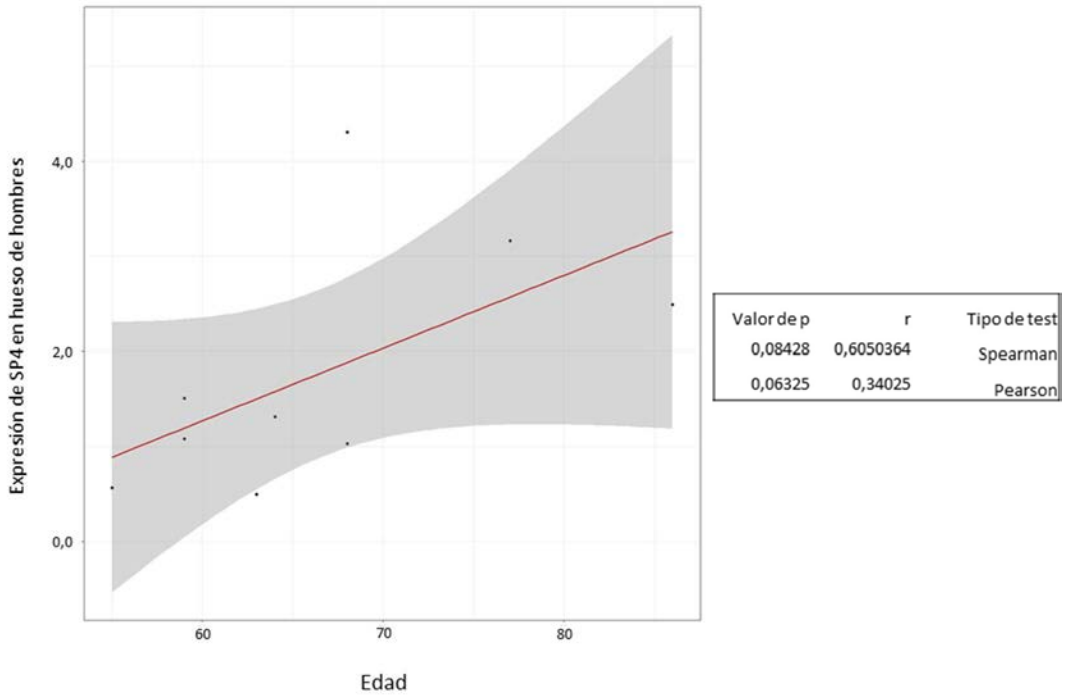
Aunque en principio no se apreciaron diferencias en la expresión de SP4 según sexos (Figura 34A), al estudiar la correlación con la edad en función del sexo si se vieron estas divergencias. En el caso de las mujeres no existía relación entre la edad y la expresión de este FTx (Figura 34B), pero en el caso de los hombres esta correlación no solo fue intensa ($r=0,6834694$) si no que fue estadísticamente significativa ($p<0,05$) (Figura 34C). La relación de la expresión de SP4 y el aumento del IMC no fue estadísticamente significativa (Figura 34D).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A



B



USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

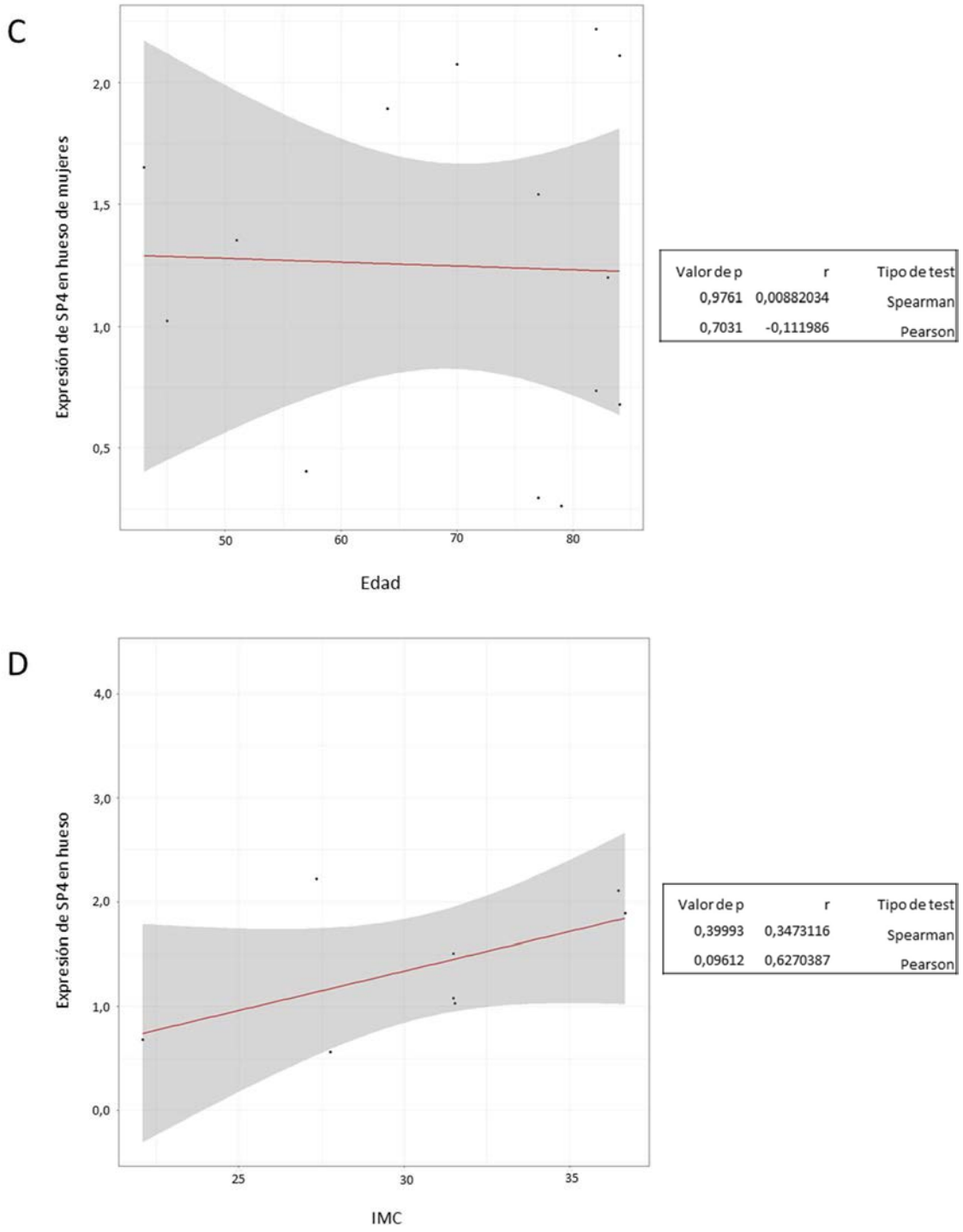
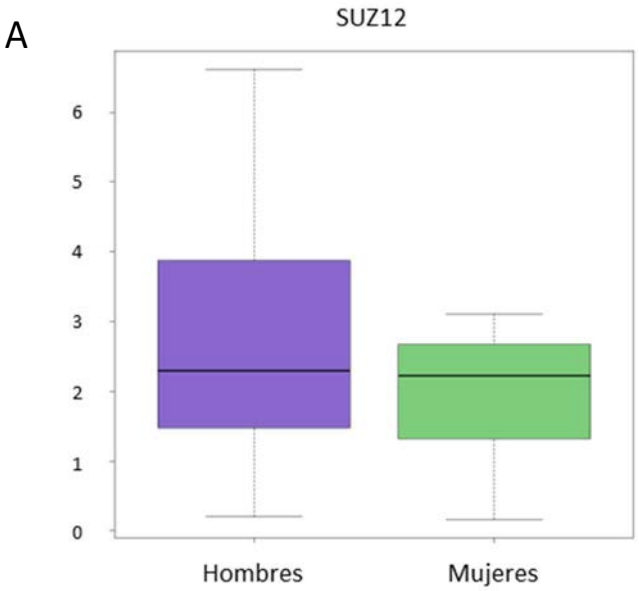


Figura 34. Expresión de SP4 en hueso en diferentes condiciones fisiopatológicas. A) Expresión de SP4 en hueso de hombres y mujeres medida por RT-PCR. B) Correlación de la expresión de SP4 en hueso con la edad en hombres. C) Correlación de la expresión de SP4 en hueso con la edad en mujeres. D) Correlación de la expresión de SP4 con el IMC.

5.5. SUZ12

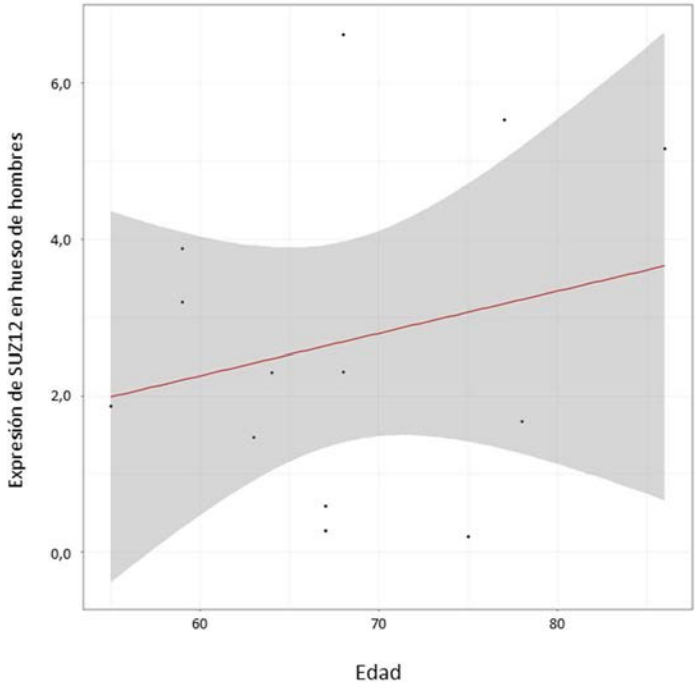
En el caso de SUZ12 ocurrió algo parecido al de SP4. No existía diferencia en la expresión del FTx en función del sexo (Figura 35A) pero si al estudiar la correlación entre la expresión y la edad corregidas por sexo. En las mujeres no existió correlación entre la edad y la expresión (Figura 35B), pero en los hombres si fue evidente esta correlación (Figura 35C).

Manteniendo la relación con SAP30 y también con SETDB1, la expresión de SUZ12 en el hueso también correlacionó con gran intensidad (r = 0,7902772) y de forma significativa (p<0,01) con el IMC de los pacientes de los que provenían las muestras (Figura 35D).



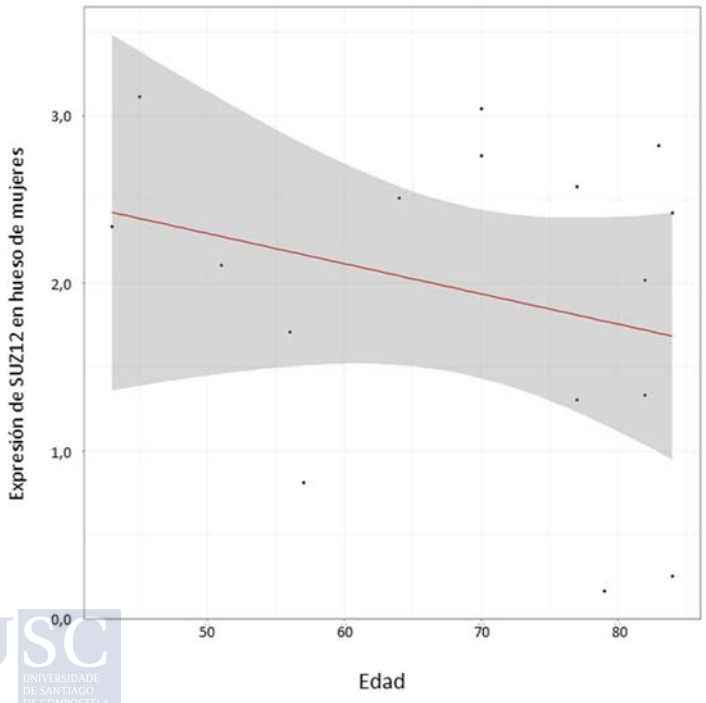
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

B



Valor de p	r	Tipo de test
0,6729	0,1296563	Spearman
0,923	0,02981047	Pearson

C



Valor de p	r	Tipo de test
0,3782	-0,2389391	Spearman
0,2481	-0,3066069	Pearson

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

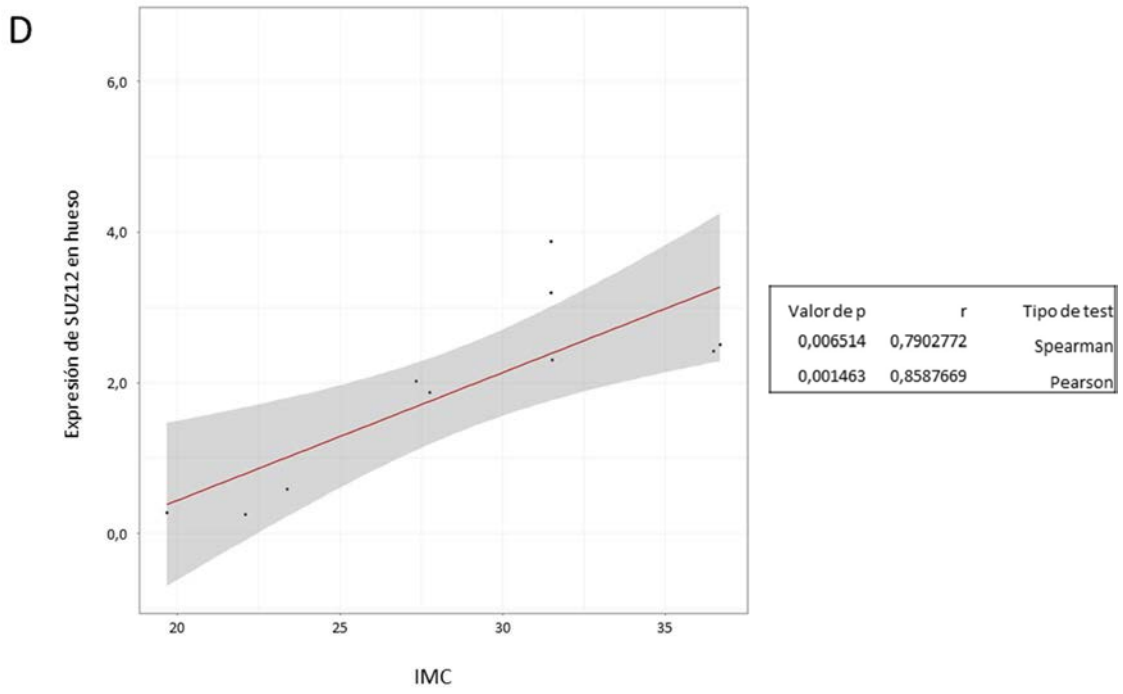


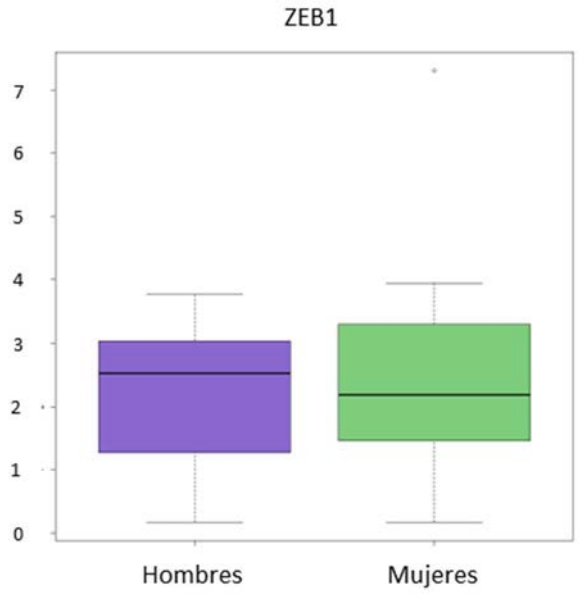
Figura 35. Expresión de SUZ12 en hueso en diferentes condiciones fisiopatológicas. A) Expresión de SUZ12 en hueso de hombres y mujeres medida por RT-PCR. B) Correlación de la expresión de SUZ12 en hueso con la edad en hombres. C) Correlación de la expresión de SUZ12 en hueso con la edad en mujeres. D) Correlación de la expresión de SUZ12 con el IMC.

5.6. ZEB1

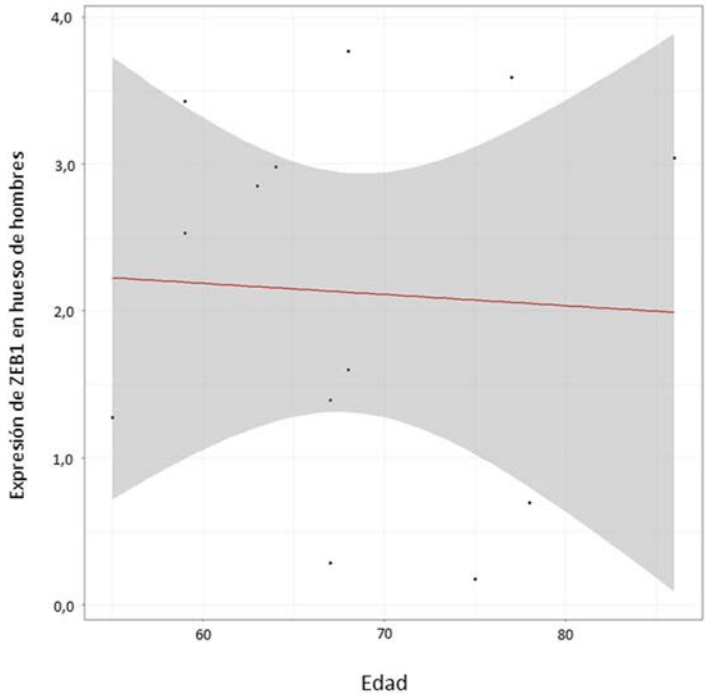
La expresión de ZEB1 no varió ni con el sexo ni con la edad (Figura 36A-C). Interesantemente, como ya se apreció en otros FTx del nodo, la expresión de ZEB1 en hueso también correlacionó de forma significativa ($p<0,01$) con el IMC, siendo el FTx con mayor coeficiente de correlación de Pearson ($r = 0,8449887$) (Figura 36D).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A

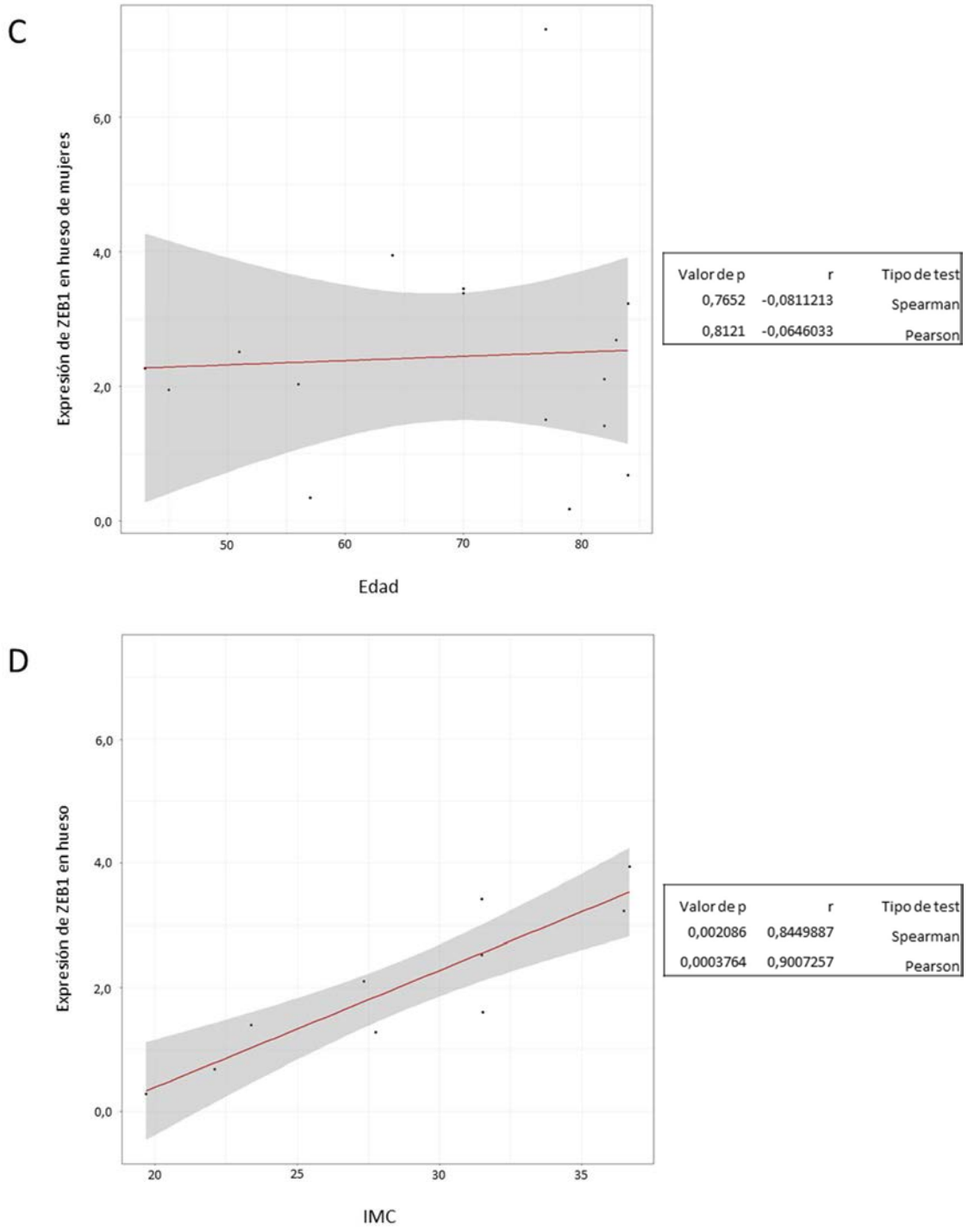


B



Valor de p	r	Tipo de test
0,943	0,02206915	Spearman
0,6098	-0,1564226	Pearson

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 36. Expresión de ZEB1 en hueso en diferentes condiciones fisiopatológicas. A) Expresión de ZEB1 en hueso de hombres y mujeres medida por RT-PCR. B) Correlación de la expresión de ZEB1 en hueso con la edad en hombres. C) Correlación de la expresión de ZEB1 en hueso con la edad en mujeres. D) Correlación de la expresión de ZEB1 con el IMC.

5.7. Nodo

Observando los resultados anteriores, se apreció un patrón de correlación con el IMC entre los FTx pertenecientes al nodo. Con la intención de confirmar esta tendencia, se realizó un análisis exacto de Fisher relacionando la pertenencia o no pertenencia al nodo de los FTx estudiados en los tejidos articulares con el hecho de correlacionar o no con el IMC. Como se observa en la figura 37A, esta relación se confirmó de forma significativamente estadística ($p<0,05$).

De esta forma, en este trabajo no solo se ha relacionado el nodo con la regulación de la adipogénesis y con el balance osteoblasto-adipocito, sino que se ha establecido una relación positiva entre la expresión de este conjunto de FTx en hueso y el aumento del IMC de los pacientes.

De igual forma, aunque a priori no se encontró un dimorfismo sexual en ninguno de los FTx pertenecientes al nodo, al observar las correlaciones de la expresión con la edad de los pacientes en función del sexo si se apreciaron diferencias en su signo. Con el fin de confirmarlas se realizó un análisis de Fisher comparando las pendientes de dichas correlaciones entre hombres y mujeres. Como se aprecia en la figura 37B esta diferencia fue estadísticamente significativa, siendo las pendientes en hombres principalmente positivas y las pendientes en mujeres más neutras o negativas. Buscando relacionar este dato con la ruptura del equilibrio osteoblástico-adipocítico se realizó el mismo análisis para los genes marcadores de osteoblastogénesis y de adipogénesis (Figura 37C). Aunque estas relaciones no fueron significativamente diferentes, si existe una tendencia semejante a la del nodo en la relación de la pendiente en los marcadores adipogénicos.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

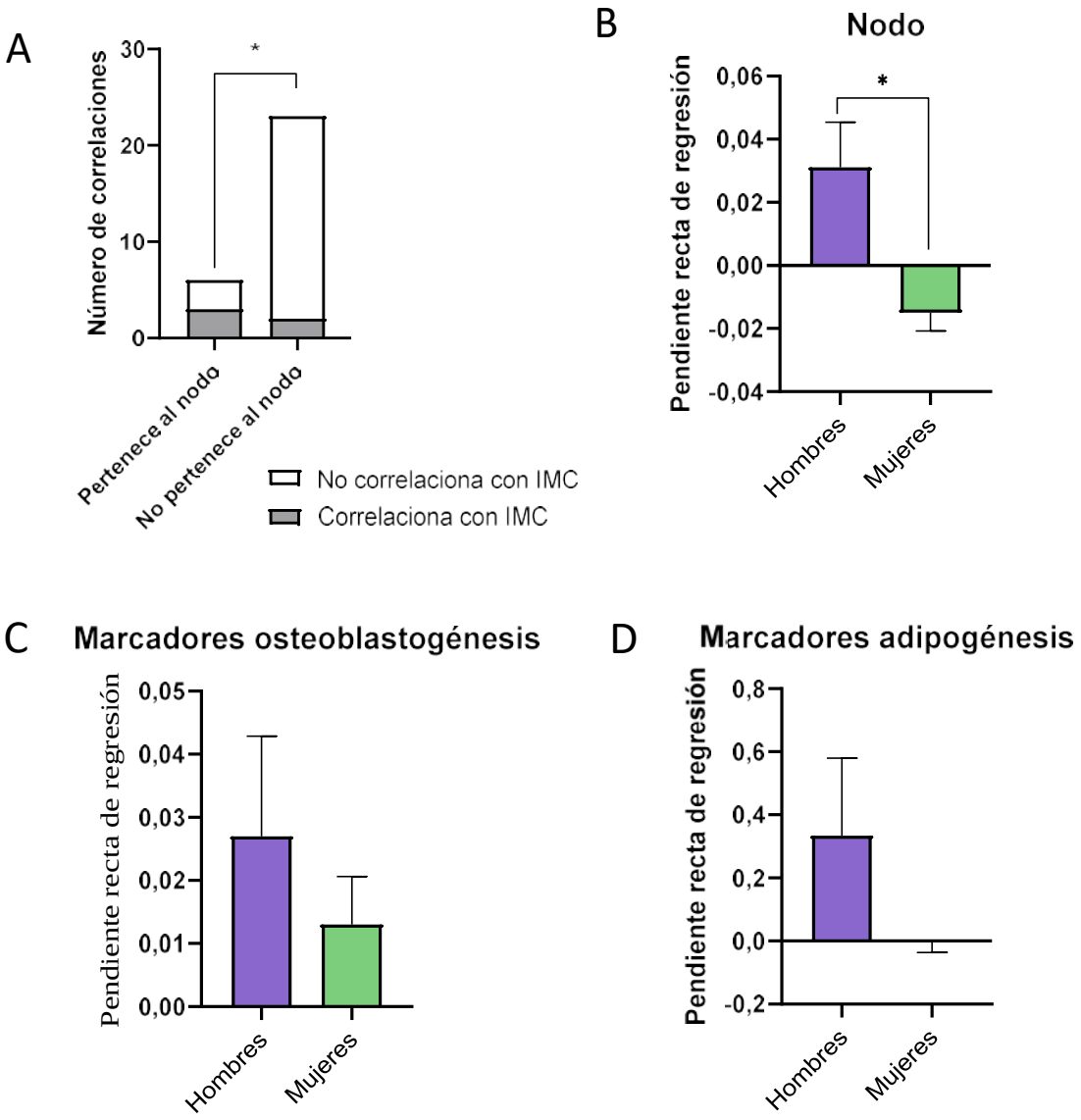


Figura 37. Relación del conjunto del nodo con las condiciones fisiopatológicas. A) Análisis de Fisher entre el hecho de ser un FTx potencialmente implicado en la osteoblastogénesis perteneciente o no al nodo y correlacionar con el IMC. B) Diferencia entre la pendiente de la correlación entre la expresión de los FTx del nodo y la edad en hombres o mujeres. C) Diferencia entre la pendiente de la correlación entre la expresión de los marcadores de osteoblastogénesis (ALPL, SPP1, GPNMB, RUNX2 y BMP2) y la edad en hombres o mujeres. D) Diferencia entre la pendiente de la correlación entre la expresión de los marcadores de adipogénesis (FABP4, PLIN2, ADIPOQ y PPARG) y la edad en hombres o mujeres.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

NUEVA TERAPIA MODULADORA DEL METABOLISMO ÓSEO PARA EL CRECIMIENTO ANORMAL DE HUESO

1. MODULACIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR DE OSTEOBLASTOS PRIMARIOS

Son numerosas las patologías donde existe crecimiento anormal de hueso: OH, FOP, HOP, osteofitos, sindesmofitos, gota, artrosis… En todas ellas existe una ruptura patológica de dos equilibrios fisiológicos, el remodelado óseo y el balance entre osteoblastogénesis y adipogénesis. Por ello, uno de los posibles abordajes terapéuticos para estas enfermedades podría ser la modulación de alguno de estos equilibrios.

Actualmente ya existen diferentes abordajes terapéuticos que modulen el remodelado óseo. Sin embargo, no se encuentra disponible ninguna aproximación terapéutica que module el equilibrio entre osteoblastogénesis y adipogénesis. Impulsados por esta necesidad, investigamos el efecto del ambiente adipogénico sobre las células osteoblásticas humanas primarias. En la figura 38A se observa una diferencia de la tasa de proliferación entre dos cultivos de hOB provenientes del mismo paciente y en las mismas condiciones de siembra, pero expuestos a diferentes medios de cultivo. En aquellas células cultivadas en presencia de medio AD la confluencia celular fue dramáticamente menor. De forma coincidente, existían diferencias significativas en la cantidad de ARN celular extraído de células de diferentes pacientes expuestas a cada una de las condiciones, a lo largo de 21 días (Figura 38B).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

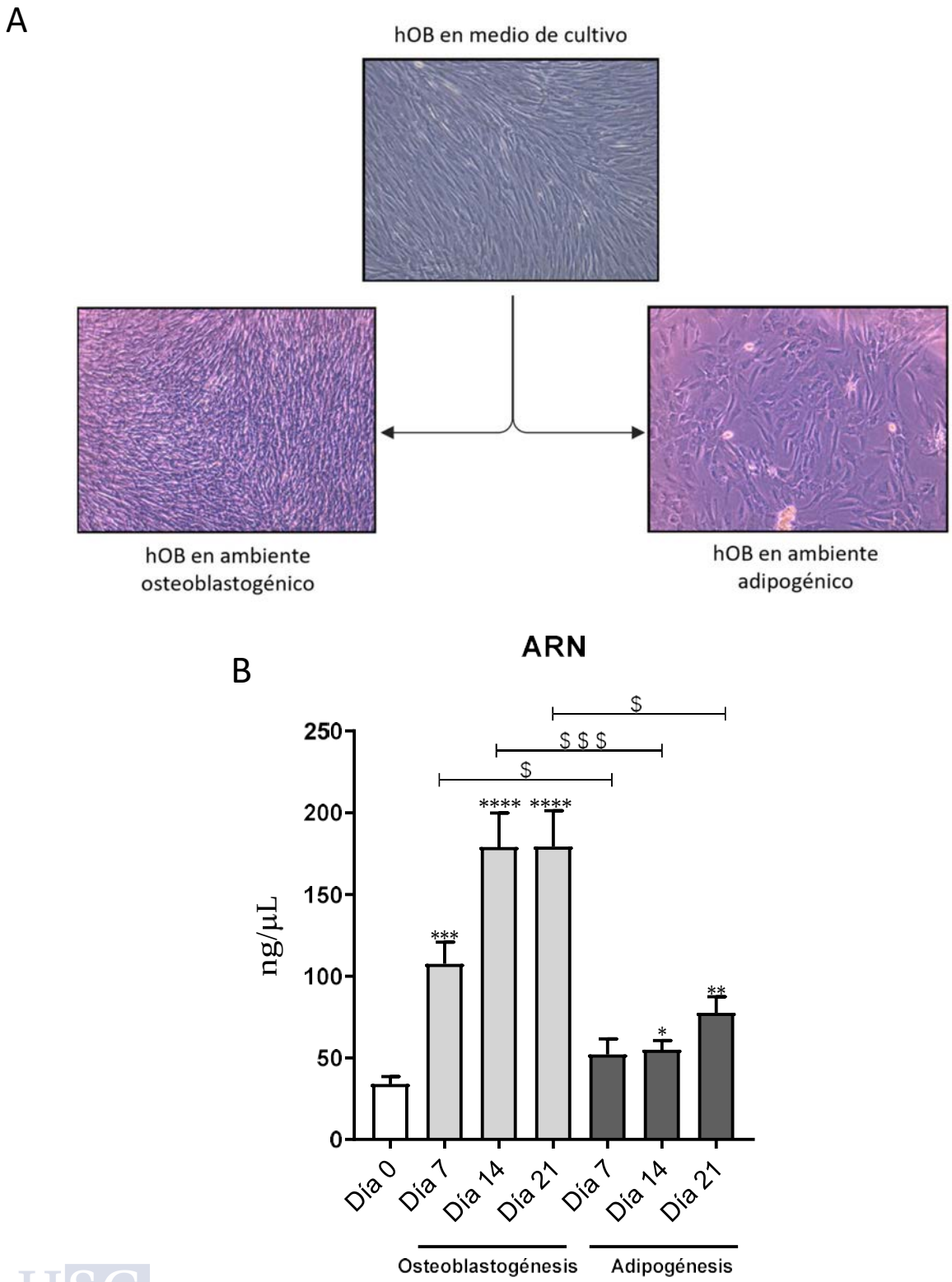


Figura 38. Crecimiento de hOB en diferentes ambientes. A) Diferencias en la celularidad entre hOB expuestas a medio de cultivo normal (DMEM:F12), medio con un ambiente osteoblastogénico, y medio con un ambiente adipogénico durante 11 días. B) Cantidad de ARN (ng/µl) de hOB sometidas durante 21 días a osteoblastogénesis y adiogénesis. Estadística * respecto a día 0, $ entre los diferentes procesos.

2. LAS TIAZOLIDINEDIONAS INHIBEN LA VÍA WNT DE SEÑALIZACIÓN

Considerando el hecho de que el ambiente proadipogénico era capaz de inhibir el crecimiento de hOB, y que ha sido descrito que la activación de PPARG puede frenar la proliferación celular (336,337) se decidió estudiar el efecto de las tiazolidinedionas como activadoras de PPARG en la activación de la vía WNT. Esta ruta es una de las principales rutas de señalización anabólica en osteoblastos, y posee un papel relevante en la osificación endocondral.

La activación de la vía WNT se evaluó mediante la medición de la inducción de expresión génica de AXIN2 (marcador de activación de la vía WNT) en la línea celular precondrogénica ATDC5, modelo celular de los estadios iniciales de osificación endocondral. Como se observa en la figura 39, las tiazolidinedionas rosiglitazona y pioglitazona fueron capaz de inhibir de forma significativa la activación de la vía WNT inducida por dos activadores de la vía WNT independientes (LiCl y 6-bromoindirubin-3-oxim (BIO)).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

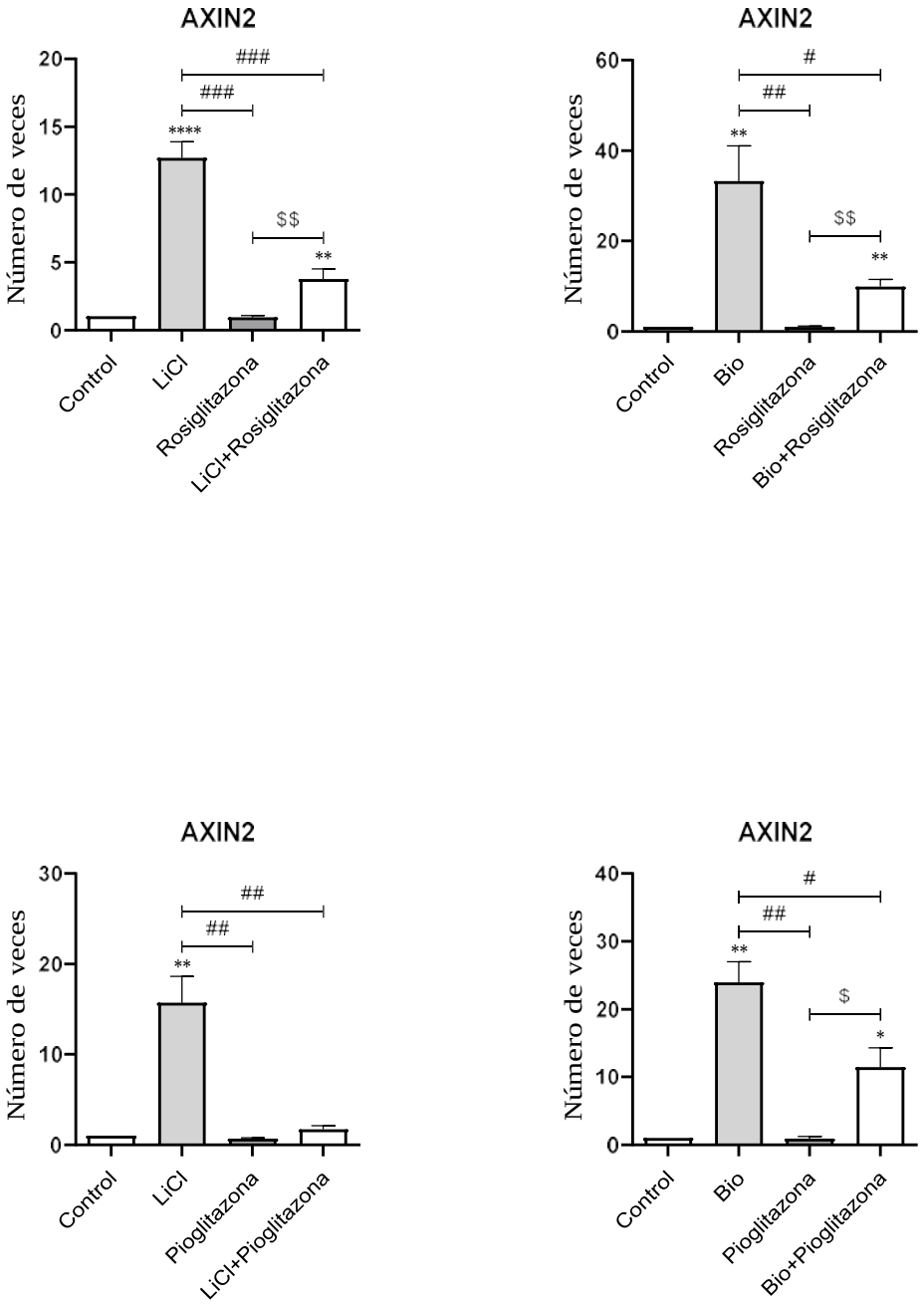


Figura 39. Bloqueo de la vía WNT por parte de las tiazolidinedionas. Expresión del evidenciador de activación de la vía WNT AXIN2 medido mediante RT-PCR en células precrondrogénicas ATDC5 en presencia o ausencia de estímulos de la vía WNT (LiCl, Bio) y tiazolidinedionas (rosiglitazona y pioglitazona). Estadística * respecto a día 0, $ entre los puntos con tiazolidinedionas, y # entre el estímulo y el resto.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3. MODULACIÓN DEL BALANCE OSTEOBLASTO-ADIPOCITO EN LÍNEAS CELULARES

3.1. Modulación del equilibrio en MSCs (C3H10T1/2).

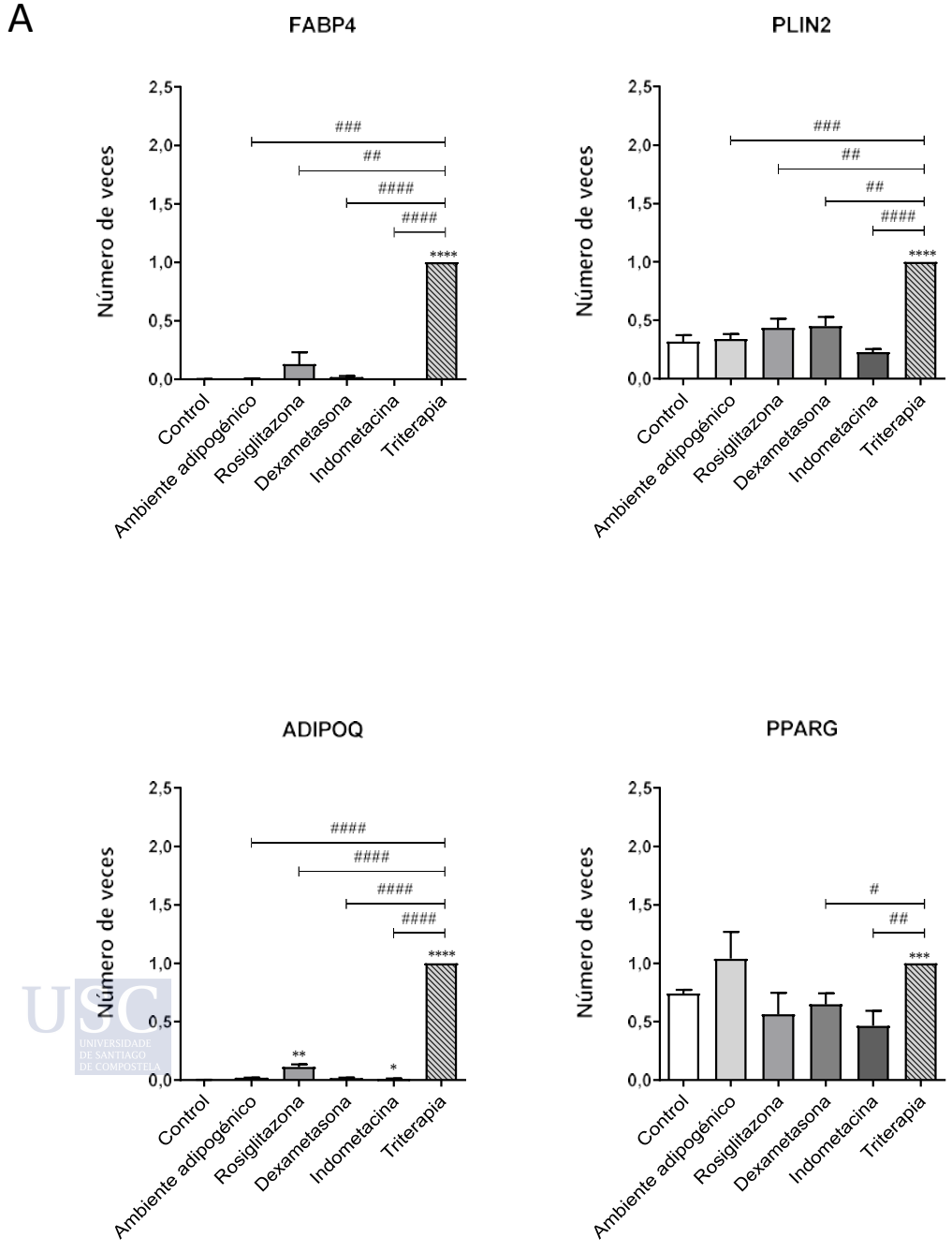
La modulación de la expresión de PPARG se ha erigido como factor clave en la modulación del equilibrio osteoblástico-adipogénico. Considerando este hecho, así como los resultados previos, se decidió buscar una terapia de reposicionamiento que permitiese controlar este equilibrio a través de la promoción del ambiente adipogénico y de la señalización de PPARG. Por ello, el primer componente de la triterapia fue una tiazolidinediona, antidiabético oral agonista de PPARG. Es sabido también que un excesivo control de la inflamación perjudica una correcta consolidación en fracturas óseas (123), por lo que se seleccionaron también dos antiinflamatorios para completar la triterapia. Los fármacos elegidos fueron la dexametasona, corticoide de amplio uso, que favorece el ambiente adipogénico en el hueso (338), y la indometacina, antiinflamatorio no esteroideo con afinidad por el receptor PPARG (339). De esta forma, la combinación de estos tres principios activos (triterapia de aquí en adelante) se testó como potencial tratamiento para el crecimiento anómalo del hueso.

Como ya se ha visto, es posible determinar diferencias en los procesos adipogénico y osteoblastogénico en C3H10T1/2 partir del día 7 de diferenciación (Figuras 9A y 10A). Por ello, se evaluó en este punto el efecto independiente de cada uno de los fármacos que componen la triterapia, así como su combinación a la hora de modular el equilibrio entre osteoblastogénesis y adipogénesis.

Tras 7 días, la triterapia en ambiente proadipogénico aumentó de forma significativa los marcadores adipogénicos estudiados (FABP4, PLIN2, ADIPOQ, PPARG) (Figura 40). Para todos aquellos genes no activados directamente por las tiazolidinedionas, la triterapia demostró un efecto sinérgico en su activación al compararla con el tratamiento de la rosiglitazona sola. El comportamiento de la pioglitazona (Figura 33B) fue equivalente al del fármaco cabeza de serie.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En un ambiente proosteoblastogénico la sinergia de la triterapia con rosiglitazona fue estadísticamente significativa en la inducción de la expresión de FABP4 y ADIPOQ. Sin embargo, el aumento de expresión de provocado por la rosiglitazona y por la combinación de fármacos fue comparable (Figura 41A). Contrariamente, aunque la inducción de FABP4 por parte de la pioglitazona fue comparable al de la rosiglitazona, la pioglitazona (sola y combinada) si incrementó de forma estadísticamente significativa la expresión de ADIPOQ. Interesantemente, la triterapia con pioglitazona demostró un efecto aditivo en la inducción de la expresión de PLIN2 (Figura 41B).



USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

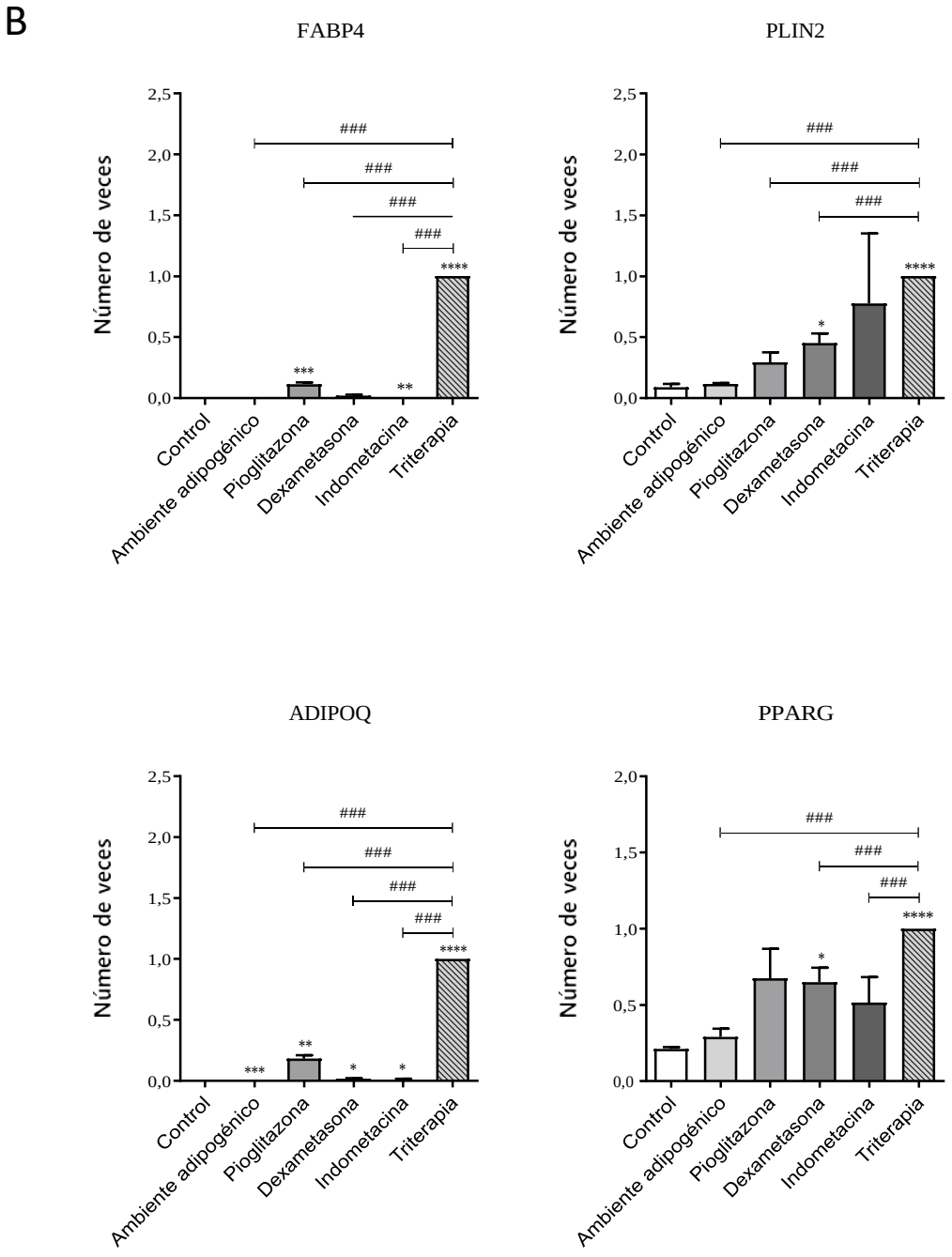
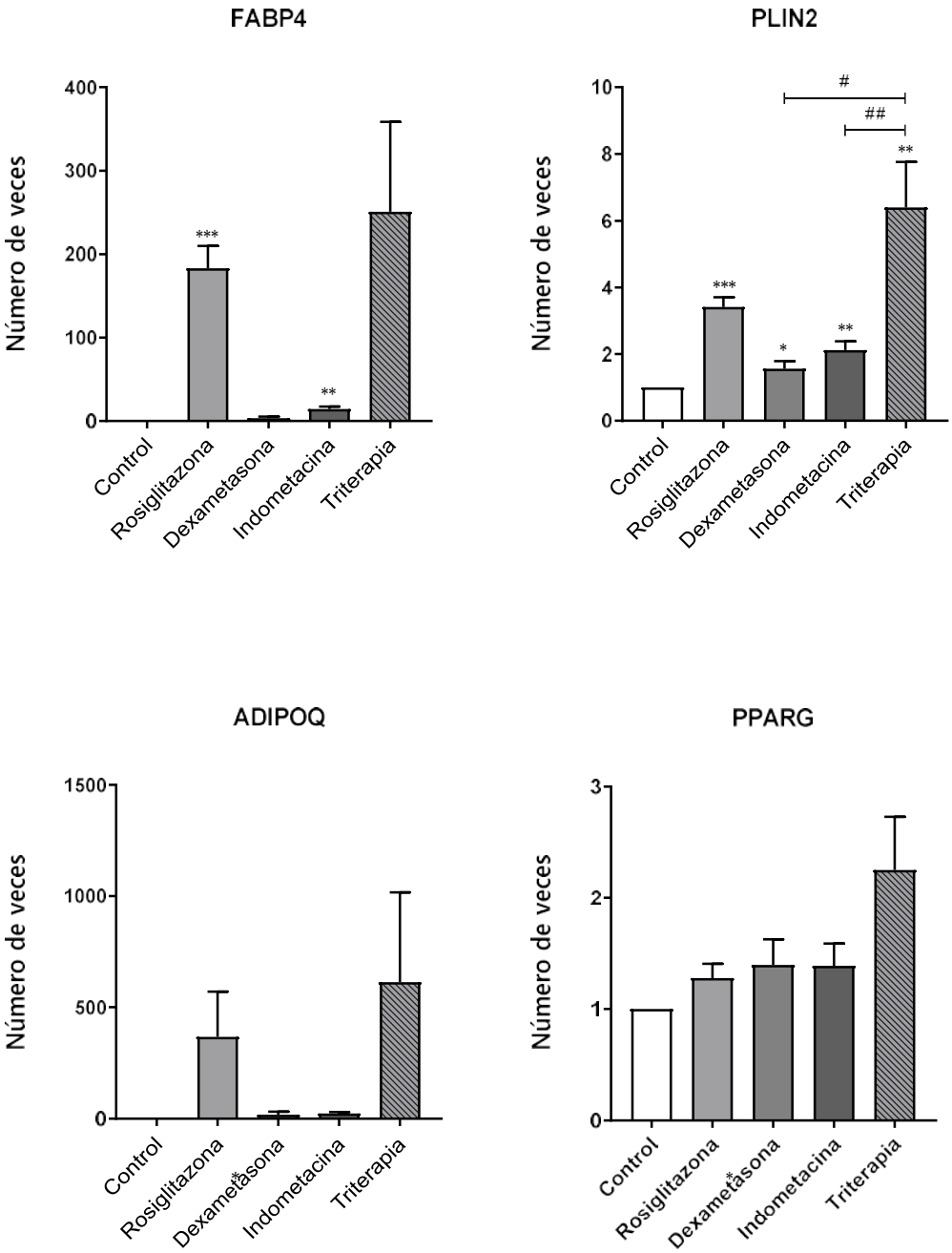


Figura 40. Efecto de la triterapia sobre C3H10T1/2 en un ambiente proadipogénico. A) Expresión de los marcadores de adipogénesis FABP4, PLIN2, ADIPOQ y PPARG medida mediante RT-PCR en C3H10T1/2 tratadas con los elementos individuales de la triterapia (rosiglitazona) y con la triterapia (con rosiglitazona) durante 7 días en un ambiente proadipogénico. B) Expresión de los marcadores de adipogénesis FABP4, PLIN2, ADIPOQ y PPARG medida mediante RT-PCR en C3H10T1/2 tratadas con los elementos individuales de la triterapia (pioglitazona) y con la triterapia (con pioglitazona) durante 7 días en un ambiente proadipogénico. Estadística * respecto a control y # entre la triterapia y sus elementos individualizados.

A



USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

B

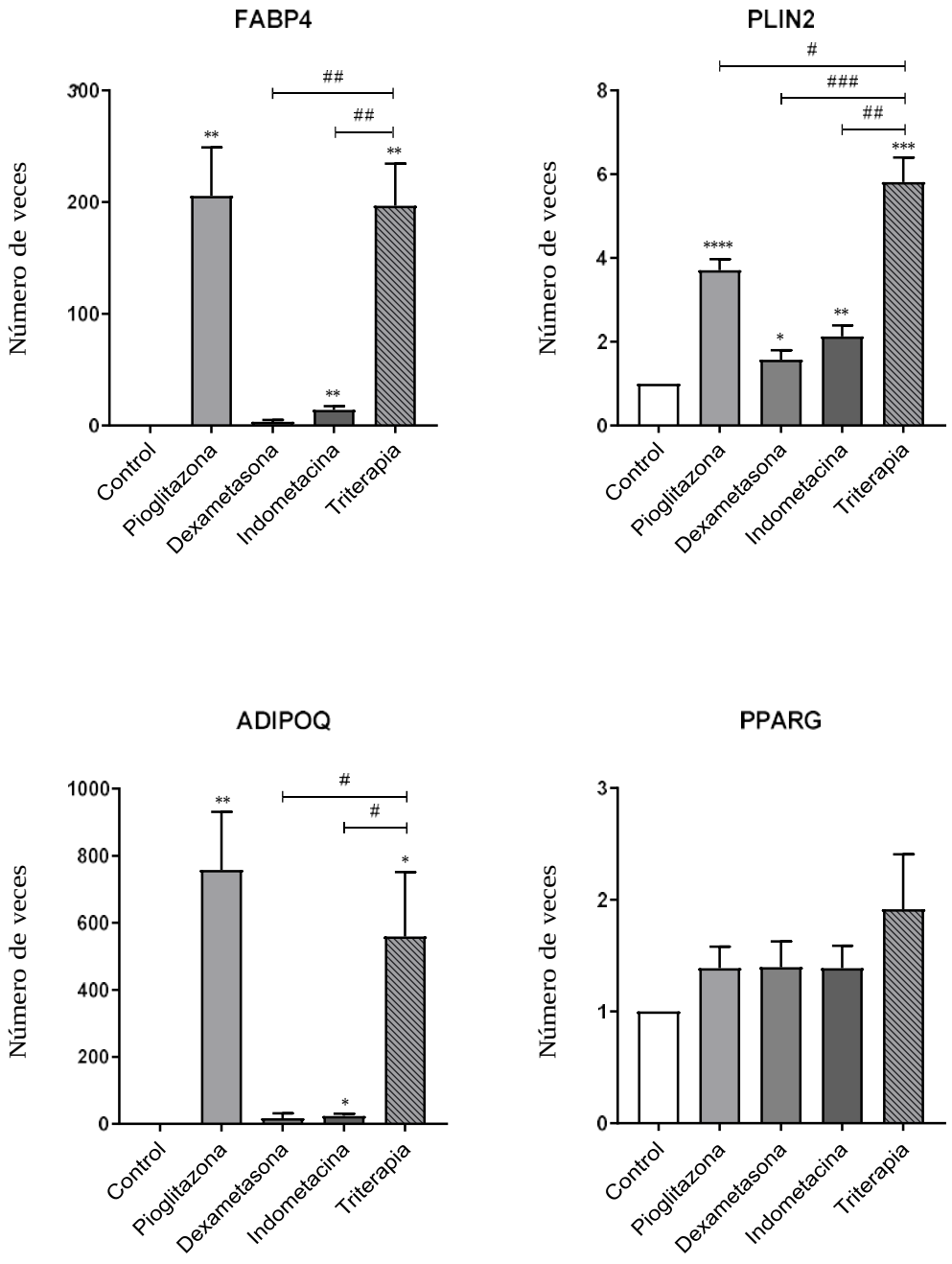


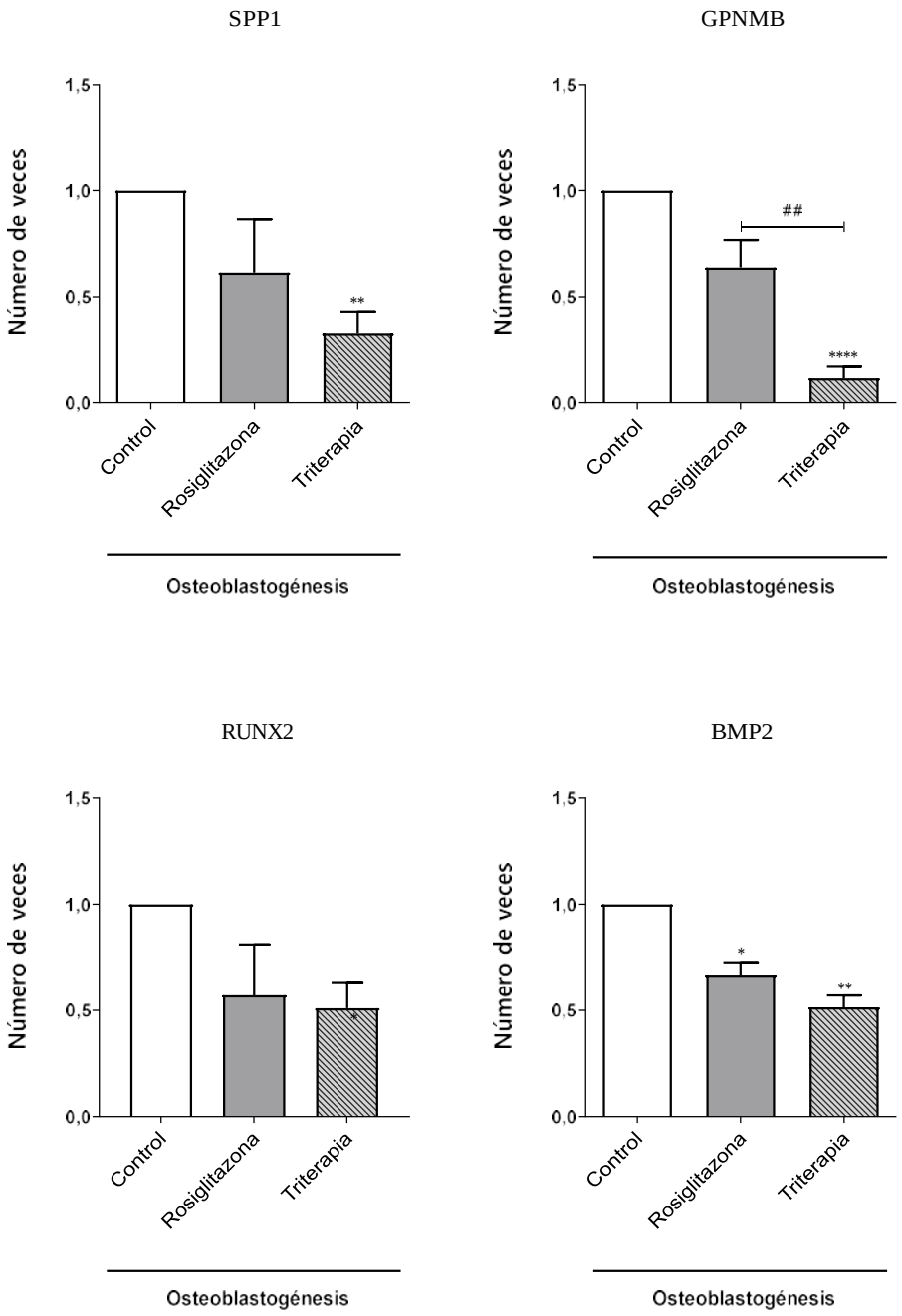
Figura 41. Efecto de la triterapia sobre C3H10T1/2 en un ambiente proosteoblastogénico. A) Expresión de los marcadores de adipogénesis FABP4, PLIN2, ADIPOQ y PPARG medida mediante RT-PCR en C3H10T1/2 tratadas con los elementos individuales de la triterapia (rosiglitazona) y con la triterapia (con rosiglitazona) durante 7 días en un ambiente proosteoblastogénico. B) Expresión de los marcadores de adipogénesis FABP4, PLIN2, ADIPOQ y PPARG medida mediante RT-PCR en C3H10T1/2 tratadas con los elementos individuales de la triterapia (pioglitazona) y con la triterapia (con pioglitazona) durante 7 días en un ambiente proosteoblastogénico. Estadística * respecto a control y # entre la triterapia y sus elementos individualizados.

3.2. Modulación de la osteoblastogénesis en células preosteoblásticas (SaOS2)

Tras comprobar el efecto de la terapia en fases tempranas de la diferenciación osteoblástica, se decidió analizar su potencial en fases más avanzadas del proceso. Para ello, se realizaron de forma concomitante la diferenciación osteoblástica de SaOS2 y su tratamiento con la triterapia durante 14 días. Como se puede observar en la figura 42A, la rosiglitazona de forma individual solo fue capaz de disminuir la expresión de GPNMB, siendo esta disminución menor que la conseguida con la triterapia. Así mismo, la triterapia redujo significativamente la expresión de SPP1, factor clave en las fases iniciales de la osteoblastogénesis. El tratamiento con pioglitazona tuvo un efecto semejante para este gen marcador, no así para GPNMB y BMP2, donde el descenso provocado por la tiazolidinediona y por la combinación de fármacos fue comparable (Figura 42B).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A



USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

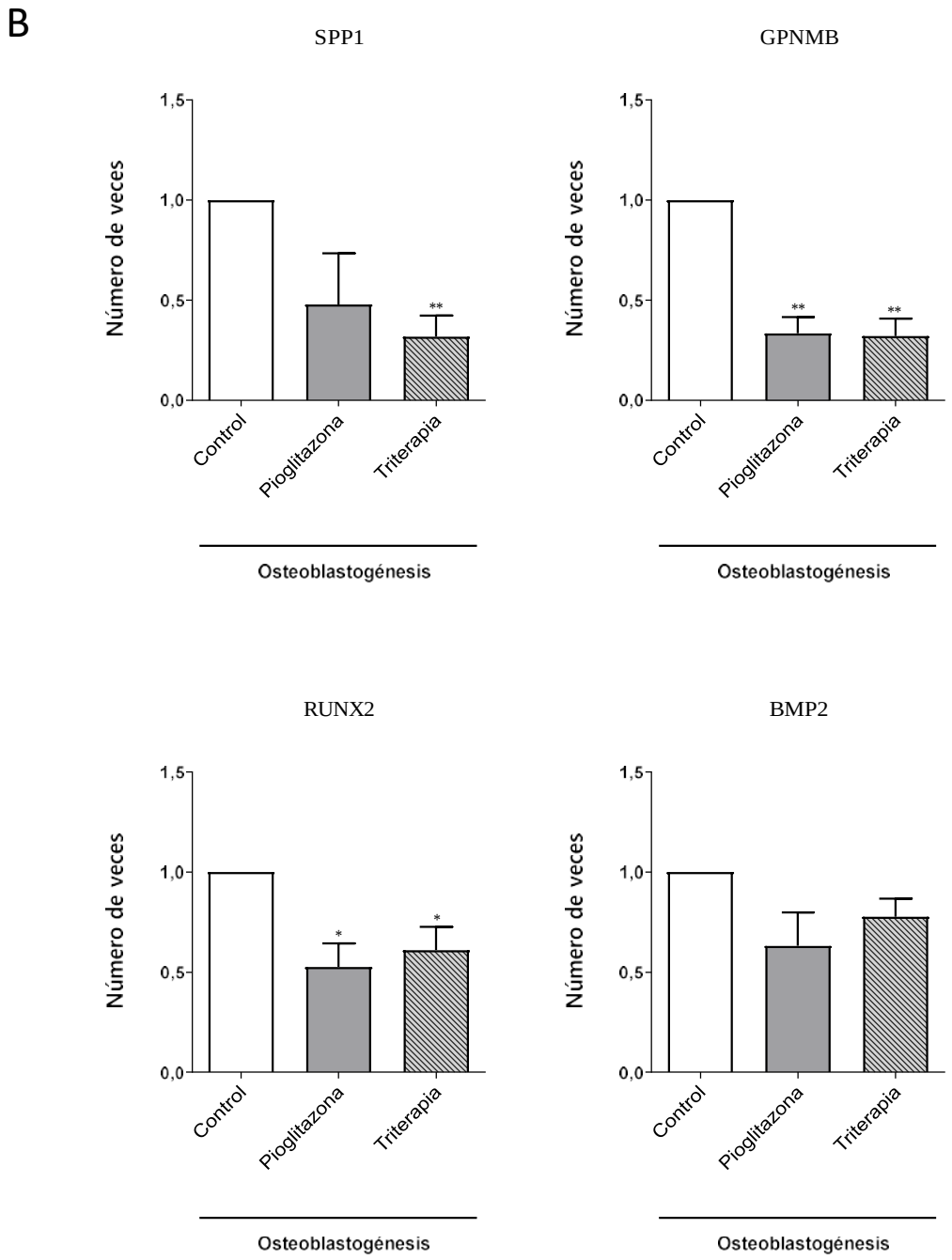


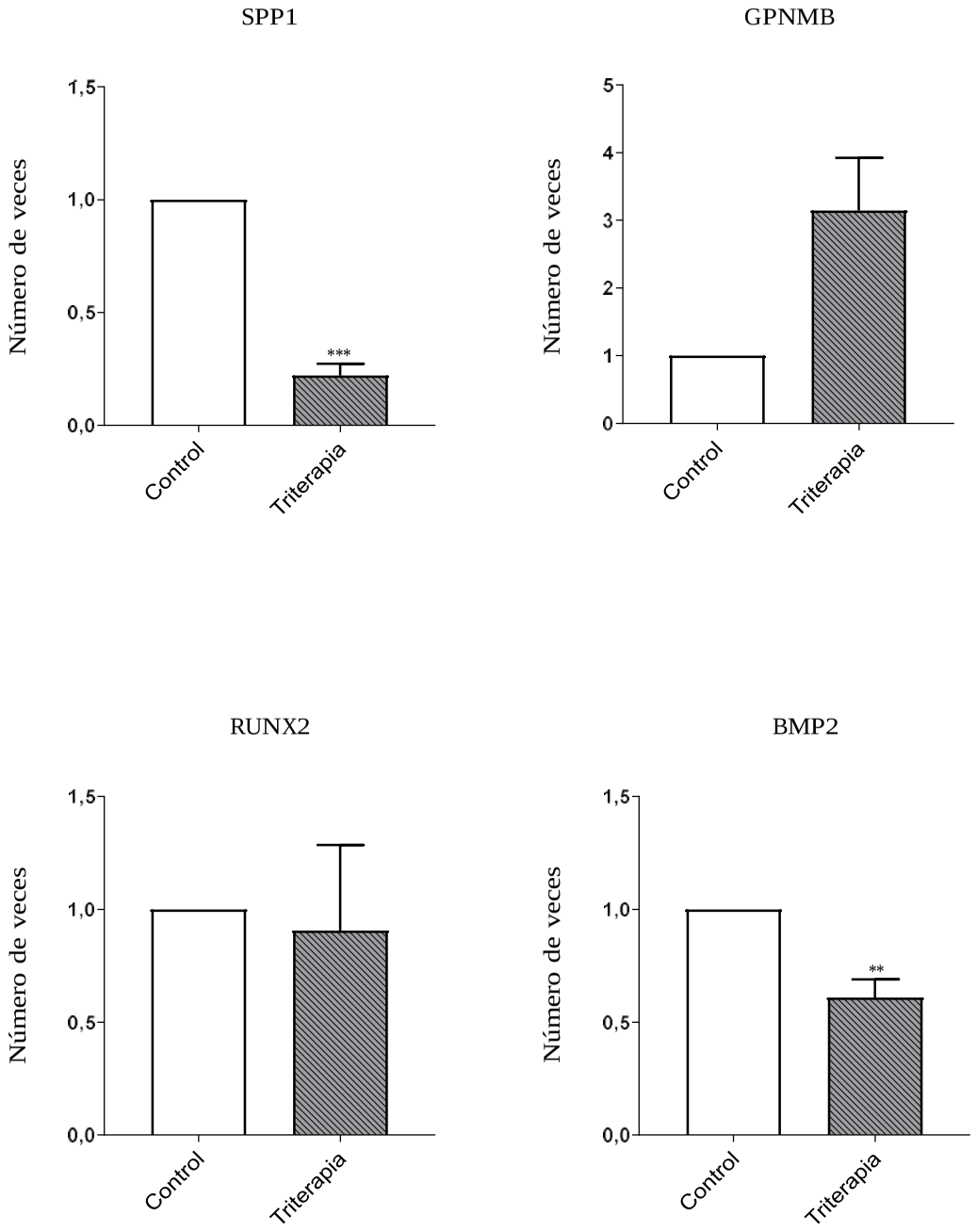
Figura 42. Efecto de la triterapia sobre SaOS2 en un ambiente proosteoblastogénico. A) Expresión de los marcadores de osteoblastogénesis SPP1, GPNMB, RUNX2 y BMP2 medida mediante RT-PCR en SaOS2 tratadas con rosiglitazona y con la triterapia (con rosiglitazona) durante 14 días en un ambiente proosteoblastogénico. B) Expresión de los marcadores de osteoblastogénesis SPP1, GPNMB, RUNX2 y BMP2 medida mediante RT-PCR en SaOS2 tratadas con pioglitazona y con la triterapia (con pioglitazona) durante 14 días en un ambiente proosteoblastogénico. Estadística * respecto a control y # entre la triterapia y la tiazolidinediona.

4. MODULACIÓN DEL BALANCE OSTEOBLASTO-ADIPOCITO EN CÉLULAS PRIMARIAS DE HUESO

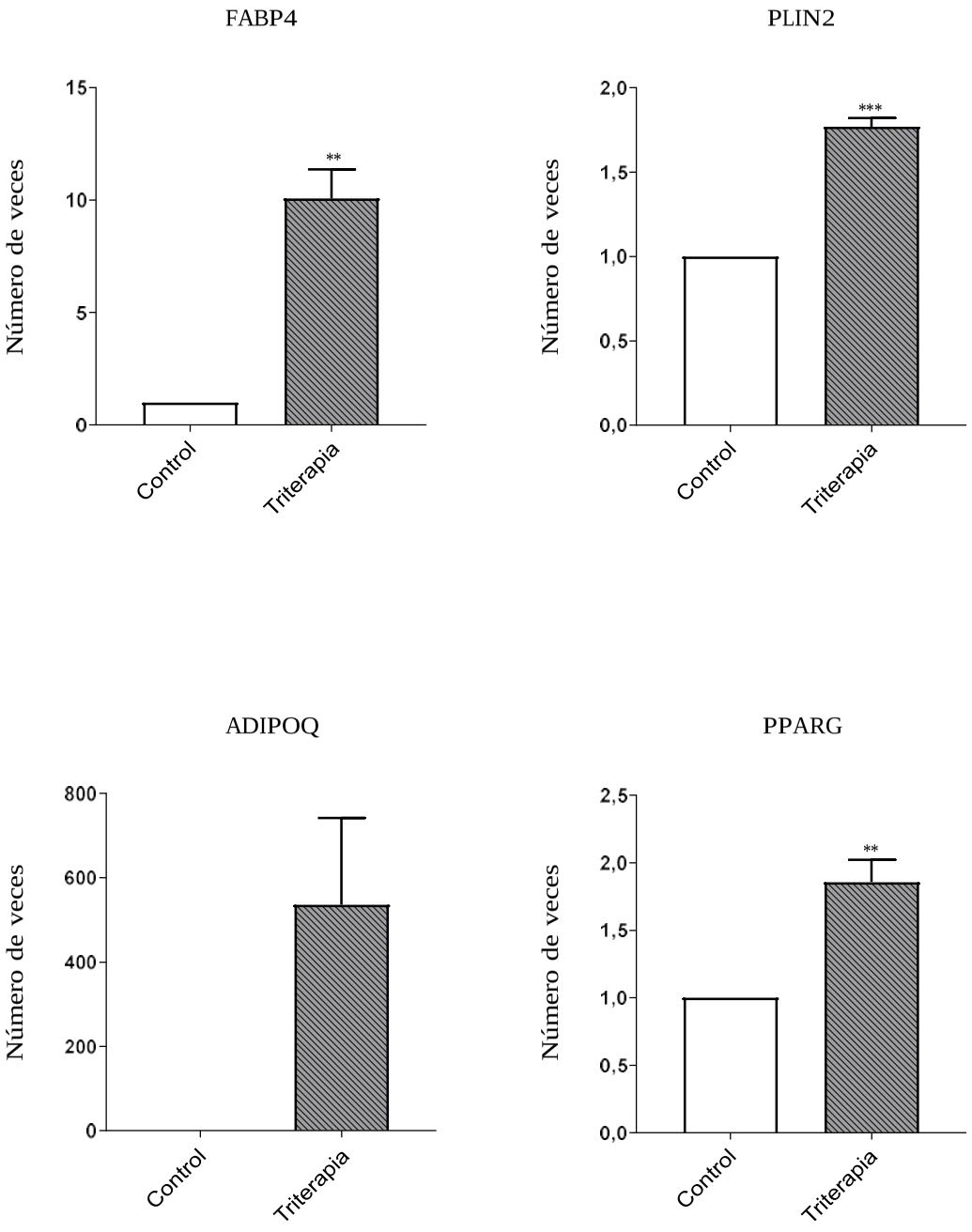
Una vez determinadas las diferencias entre el efecto de las tiazolidinedionas y la triterapia, y debido a la dificultad para obtener células preosteoblásticas primarias humanas, en estas células se evaluó únicamente el efecto de la triterapia con pioglitazona durante los siete primeros días de diferenciación osteoblástica. Como se observa en la figura 43A, la triterapia disminuyó de forma significativa la expresión de los marcadores osteoblásticos SPP1 y BMP2, aumentando al mismo tiempo la expresión de los marcadores adipogénicos FABP4, PLIN2 y PPARG (Figura 43B). Estas modulaciones confirmaron el potencial de la triterapia como fármaco modulador de la osteoblastogénesis.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A


SPP1
Número de veces
1,5
1,0
0,5
0,0
***
Control
Triterapia
GPNMB
Número de veces
5
4
3
2
1
0
Control
Triterapia
RUNX2
Número de veces
1,5
1,0
0,5
0,0
Control
Triterapia
BMP2
Número de veces
1,5
1,0
0,5
0,0
**
Control
Triterapia

B



USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

C

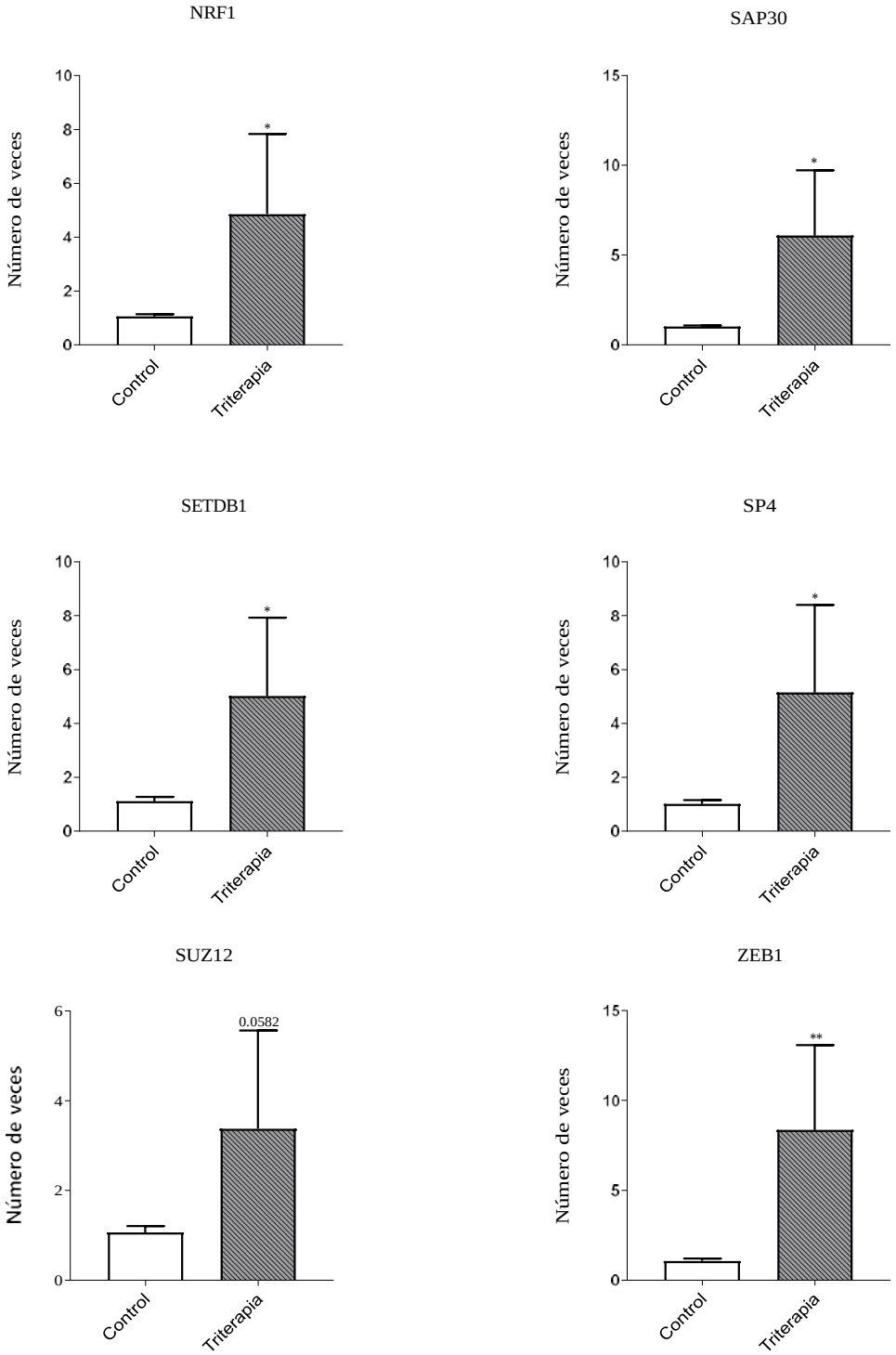


Figura 43. Efecto de la triterapia sobre hOB en un ambiente proosteoblastogénico. A) Expresión de los marcadores de osteoblastogénesis SPP1, GPNMB, RUNX2 y BMP2 medida mediante RT-PCR en hOB tratadas con triterapia (pioglitazona) durante 7 días en un ambiente proosteoblastogénico. B) Expresión de marcadores adipogénicos (FABP4, PLIN2, ADIPOQ y PPARG) medida mediante RT-PCR en hOB tras 7 días en un ambiente proosteoblastogénico con triterapia (pioglitazona). C) Expresión del nodo (NRF1, SAP30, SETDB1, SP4, SUZ12 y ZEB1) medida mediante RT-PCR en hOB tras 7 días en un ambiente proosteoblastogénico con triterapia (pioglitazona). Estadística * respecto a control.

4.1. Expresión del nodo en células primarias de hueso tratadas con la triterapia

En vista de la capacidad de la triterapia para alterar la osteoblastogénesis, y de los resultados obtenidos respecto a los FTx implicados en la regulación del equilibrio osteoblasto-adipocito, estudiamos la modulación de estos FTx por parte de la agrupación de fármacos. El tratamiento con la triterapia aumentó de forma significativa ($p<0,05$) la expresión de NRF1, SAP30, SETDB1, SP4 y ZEB1, apoyando de esta forma el potencial proadipogénico tanto de la triterapia como del nodo de FTx (Figura 43C).

5. Modulación del balance osteoblasto-adipocito en osificación heterotópica

La OH adquirida puede deberse a varias situaciones traumáticas, tales como intervenciones quirúrgicas, grandes quemaduras o electrocuciones, traumatismos, etc. Las células empleadas en este trabajo provenían de una osificación heterotópica secundaria a un traumatismo craneoencefálico con rotura de hueso largo concomitante. La OH congénita puede deberse a diversas mutaciones y/o fenotipos. En el caso que nos ocupa, las células provenían de un paciente con HOP, asociada a una mutación congénita en la proteína GNAS.

Kaplan *et al.* propusieron cuatro principios claves para el control preventivo y tratamiento de la OH presente en la FOP y en otras patologías: regulación de las vías de señalización implicadas, control de la inflamación asociada a la OH, modulación de los osteoprogenitores en los tejidos con potencial osificante y control del ambiente proosificación (191). En vista de estas claves consideramos nuestra triterapia como potencial terapia para el crecimiento óseo anormal que se produce en estas patologías concretas. Estas osificaciones surgen en tejidos blandos (Figura 44), incluso en tejido adiposo, por lo que se estudió el efecto de la triterapia en un contexto proadipogénico más semejante al ambiente encontrado en los tejidos afectados por esta patología. Asimismo, dado que la pioglitazona es la única tiazolidinediona autorizada para uso clínico en el momento actual, los experimentos se llevaron a cabo únicamente con este principio activo.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



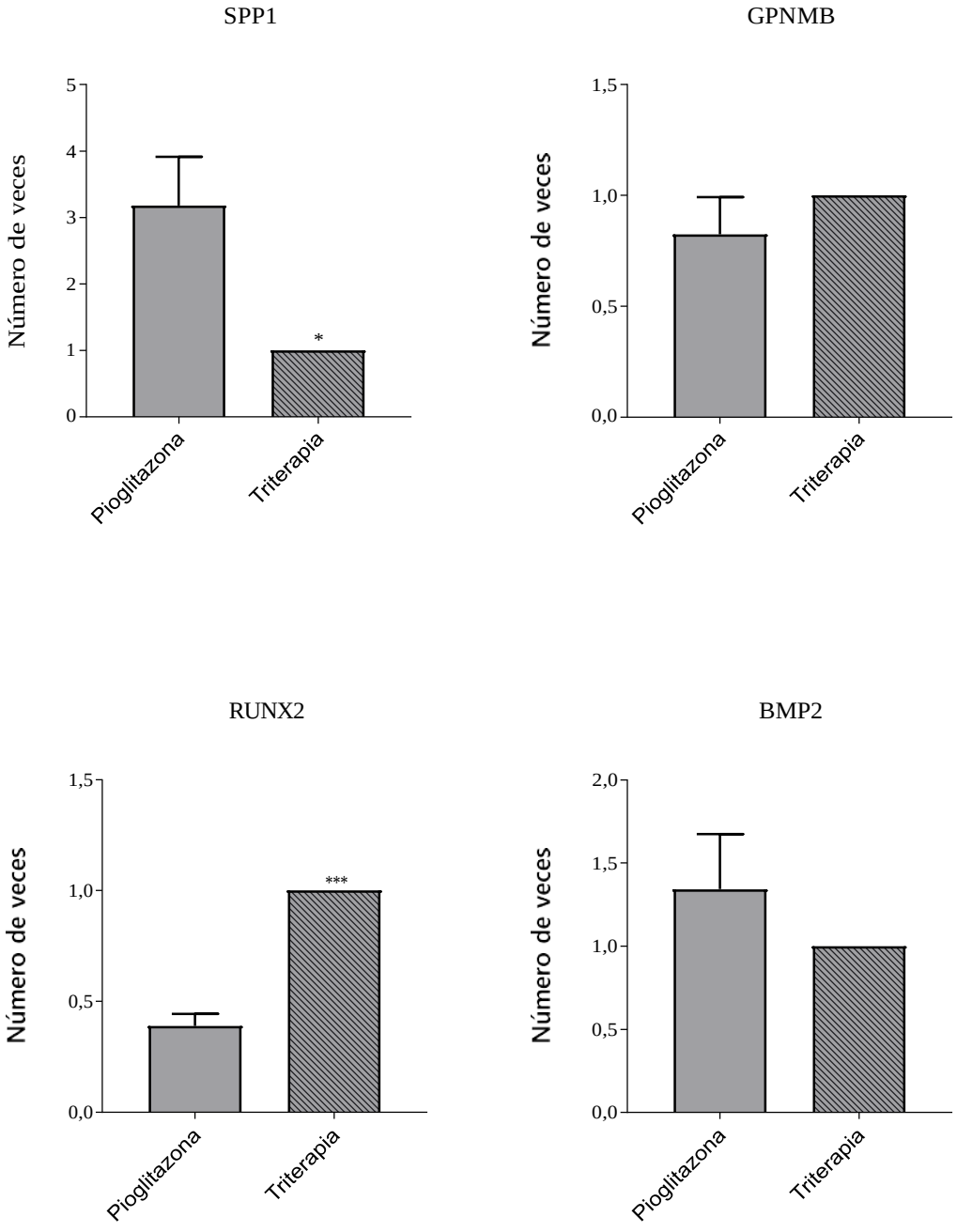
Figura 44. Placa de osificación heterotópica

5.1. Osificación heterotópica adquirida

Tras diferenciar las células OH hOB durante 7 días en presencia de pioglitazona no se observaron diferencias significativas en la expresión de genes marcadores de adipogénesis y osteoblastogénesis. No obstante, sí se produjo un aumento significativo de la expresión de FABP4, ADIPOQ, PPARG, y RUNX2, así como un descenso de SPP1 en aquellas células tratadas con la combinación de fármacos propuesta como terapia (Figura 45).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A



USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

B

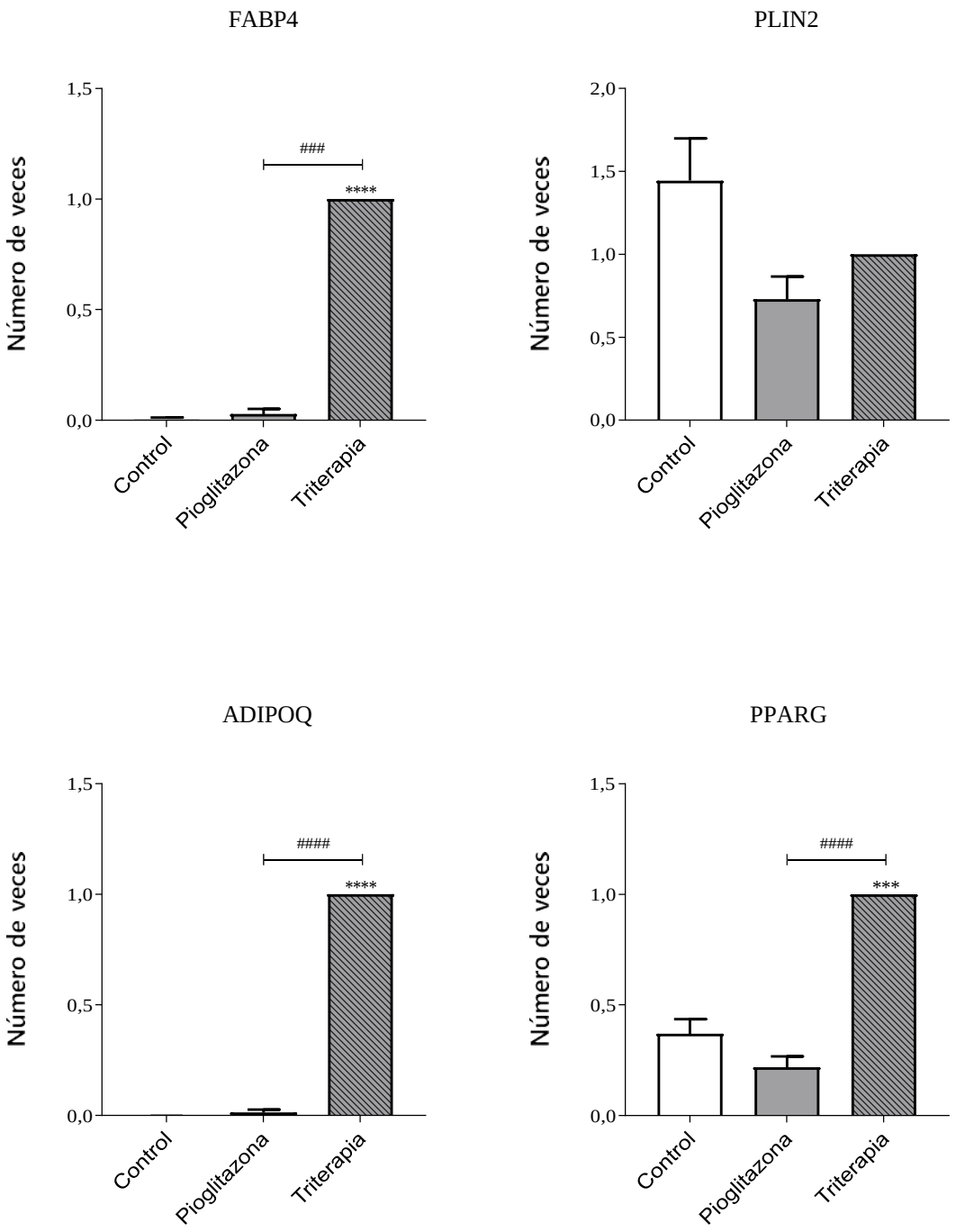
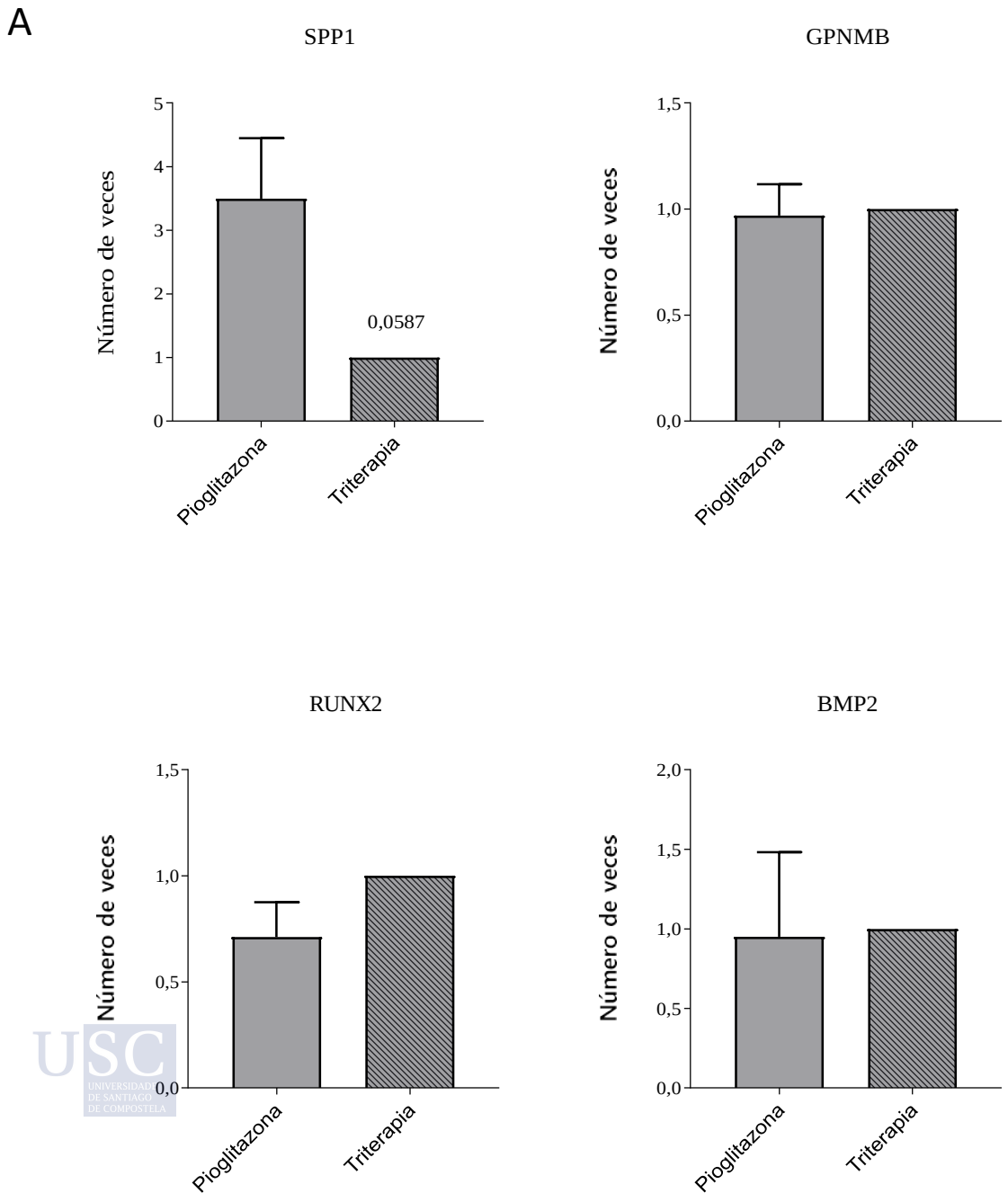


Figura 45. Efecto de la triterapia sobre hOH de OH adquirida en un ambiente proadipogénico. A) Expresión de los marcadores de osteoblastogénesis SPP1, GPNMB, RUNX2 y BMP2 medida mediante RT-PCR en hOH tratadas con la triterapia (con pioglitazona) durante 7 días en un ambiente proadipogénico. B) Expresión de los marcadores de adipogénesis FABP4, PLIN2, ADIPOQ y PPARG medida mediante RT-PCR en hOH tratadas con pioglitazona y la triterapia (con pioglitazona) durante 7 días en un ambiente proadipogénico. Estadística * respecto a control, y # respecto a la tiazolidinediona.

5.2. Osificación heterotópica congénita

En células OH hOB de OH congénita, el tratamiento simultáneo con la triterapia produjo un aumento significativo de la expresión de FABP4, PLIN2 y ADIPOQ respecto al tratamiento con la tiazolidinediona de forma individual. Además de este aumento del perfil adipogénico, se pudo apreciar un descenso no significativo en la expresión de SPP1 (Figura 46).



USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

B

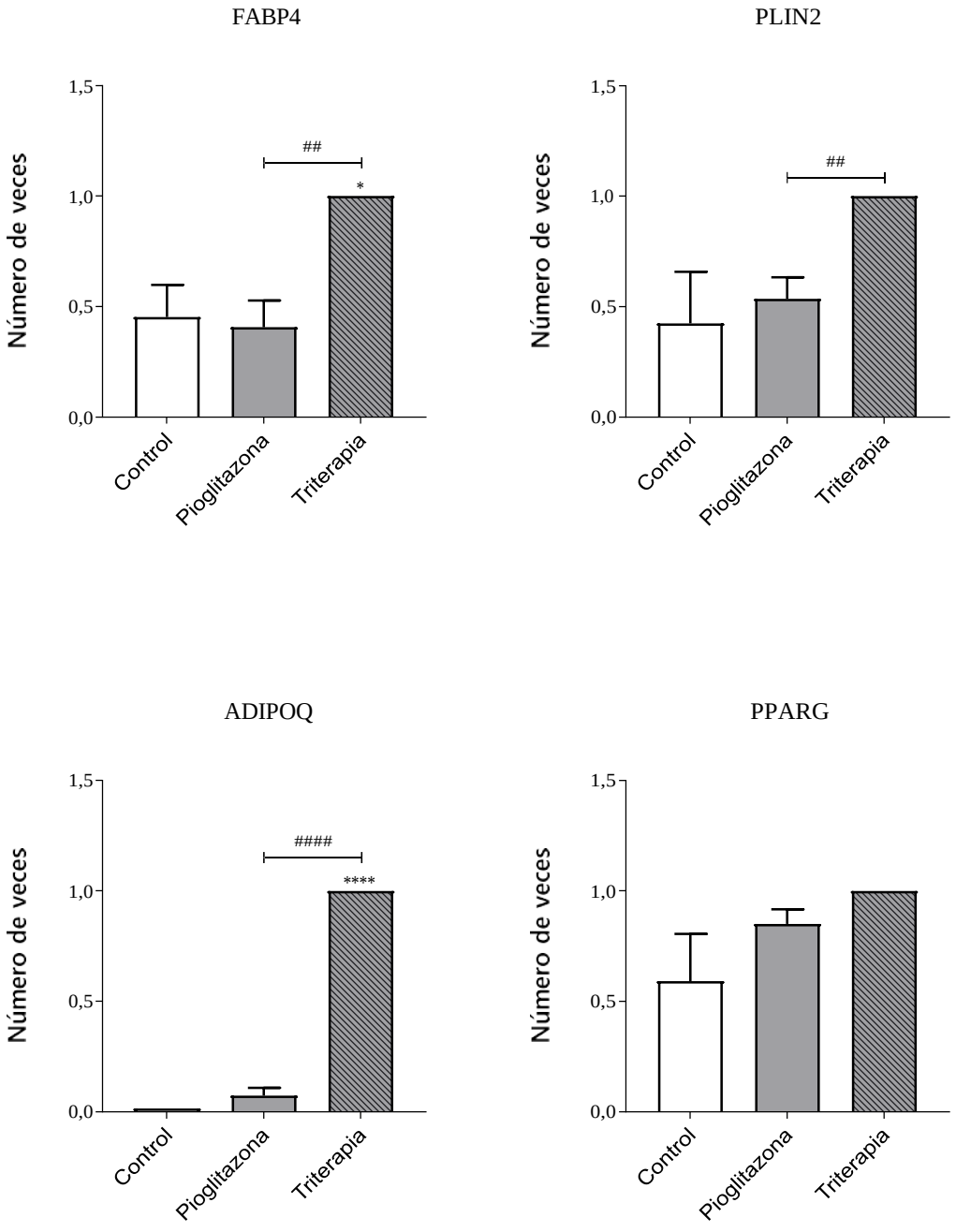


Figura 46. Efecto de la triterapia sobre hOH de OH congénita en un ambiente proadipogénico. A) Expresión de los marcadores de osteoblastogénesis SPP1, GPNMB, RUNX2 y BMP2 medida mediante RT-PCR en hOH tratadas con la triterapia (con pioglitazona) durante 7 días en un ambiente proadipogénico. B) Expresión de los marcadores de adipogénesis FABP4, PLIN2, ADIPOQ y PPARG medida mediante RT-PCR en hOH tratadas con pioglitazona y la triterapia (con pioglitazona) durante 7 días en un ambiente proadipogénico. Estadística * respecto a control, y # respecto a la tiazolidinediona.

5.3. Tratamiento de un caso clínico de heteroplasia ósea progresiva

En el Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela se describió el caso de un paciente con heteroplasia ósea progresiva (340). Dicho paciente fue tratado con las herramientas terapéuticas disponibles para dicha patología, así como con aquellos principios activos sugeridos por la literatura. Todas las administraciones medicamentosas fueron aprobadas como uso compasivo por todos los departamentos implicados en el manejo y tratamiento del paciente (340). Ninguno de estos tratamientos invirtió de forma efectiva la relación entre PNPI y βCTX, manteniendo el remodelado óseo patológico inalterado (340). En vista de estos resultados Justicia-Grande et al. se pusieron en contacto con el grupo de patología musculoesquelética para realizar un abordaje conjunto del caso clínico. Basándonos en la evidencia descrita previamente sobre la triterapia, así como en la biovalidación del tratamiento sobre las células preosteoblásticas obtenidas del paciente, se propuso la administración de la triterapia para evitar recidivas tras la escisión quirúrgica de una placa de osificación. El ajuste de la pauta clínica se realizó conforme al criterio de los servicios médicos implicados, administrando la combinación 3 días antes de la cirugía, y manteniéndose así hasta completar una semana de tratamiento. Tras los 7 primeros días se procedería a la retirada controlada del corticoide para evitar un síndrome de Cushing exógeno. No obstante, el inicio del tratamiento coincidió con el día de la cirugía (14/06/2019) y la retirada de la dexametasona se realizó de forma brusca tras los 4 primeros días de tratamiento. Como se observa en la figura XA, tras cuatro días de tratamiento con la triterapia aumentó la expresión del marcador de resorción ósea βCTX y disminuyó la del marcador de formación ósea PNPI. Es más, estos cambios invirtieron la relación entre ambos marcadores, indicando un cambio en la dinámica de remodelado que se venía observando con los tratamientos anteriores (Figura 47). Esta ratio positiva para la destrucción de hueso se mantuvo hasta 27 días después de la cirugía, donde se realizó el último registro (Figura 47). Estos datos respaldan la propuesta de la triterapia propuesta en este trabajo como tratamiento para la prevención del crecimiento anómalo del hueso.

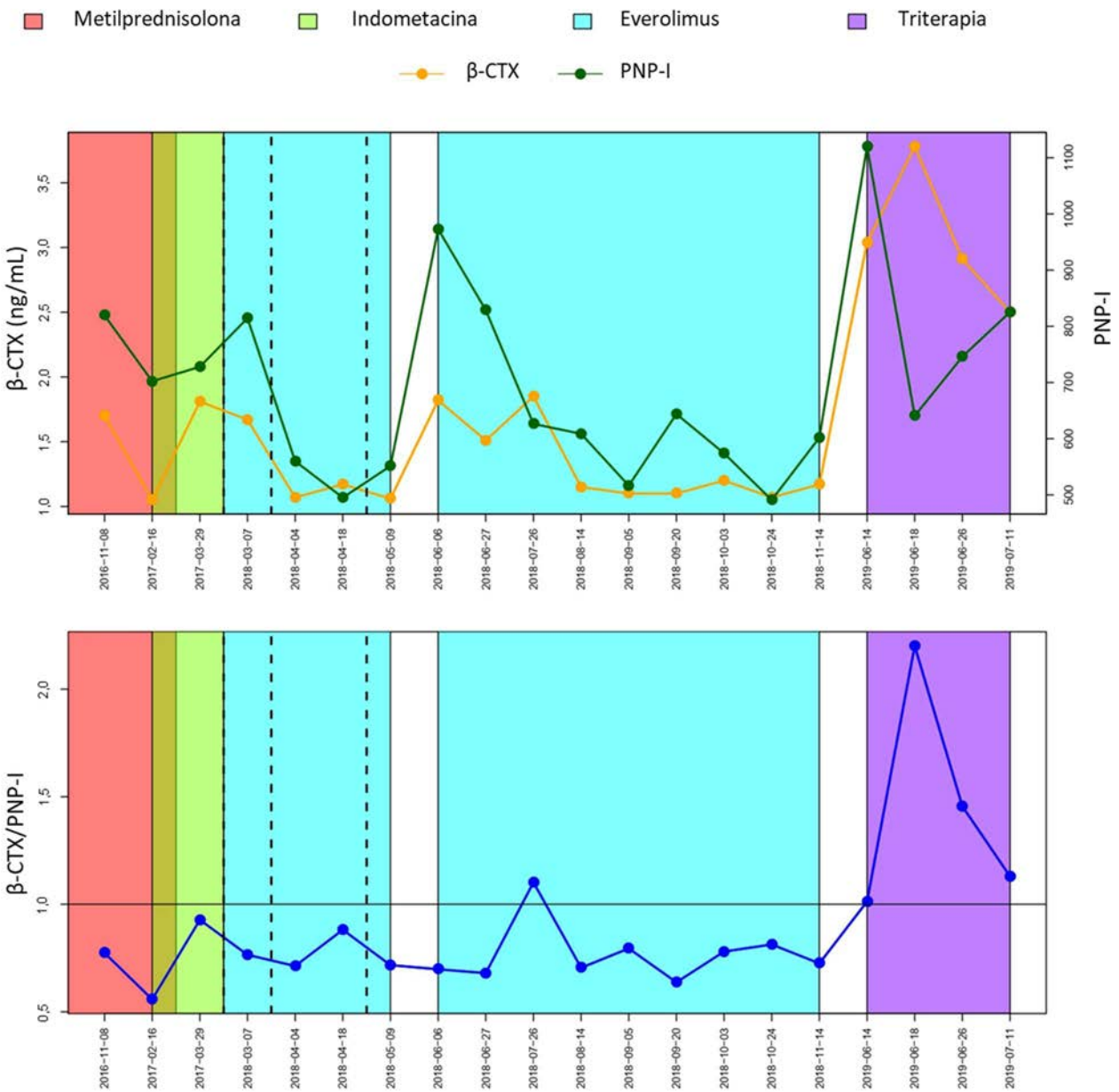


Figura 47. Efecto de la administración sistémica de la triterapia en un caso clínico de heteroplasia ósea progresiva. A) Valores de β-CTx y PNP-I en suero de un paciente de HOP desde 08/11/2016 hasta 11/07/2019 en presencia de tratamiento con metilprednisolona, indometacina, everolimus y la triterapia. B) Ratio entre los valores de β-CTx y PNP-I en suero de un paciente de HOP desde 08/11/2016 hasta 11/07/2019 en presencia de tratamiento con metilprednisolona, indometacina, everolimus y la triterapia

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

DISCUSIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DISCUSIÓN

En esta tesis doctoral se ha realizado un estudio exhaustivo de la literatura que nos permitió identificar y mejorar un protocolo de diferenciación dual de MSCs a osteoblasto y adipocito para estudiar su balance y relación. Utilizando este protocolo fuimos capaces de evaluar los mecanismos de regulación de dicho equilibrio. También pudimos identificar, gracias a la firma epigenética de la osteoblastogénesis, cómo un conjunto de FTx (nodo) regulaba el equilibrio entre osteoblastogénesis y adipogénesis. Gracias a ello identificamos una terapia para el tratamiento y prevención de la osificación heterotópica basada en un cóctel de fármacos que modificaban tanto el equilibrio entre osteoblastogénesis y adipogénesis, como la expresión de los FTx del nodo. Posteriormente, esta terapia se aplicó en un caso clínico de HOP mostrando resultados prometedores.

Aunque una diferenciación osteoblástica ineficaz es inherente a muchas patologías musculoesqueléticas (14,341), el mecanismo regulatorio de los factores de transcripción implicados en este proceso no se conoce tan en profundidad como en el caso de la adipogénesis. De hecho, no existe un protocolo estandarizado que permita estudiar in vitro esta diferenciación desde los primeros estadios y de forma paralela a la diferenciación adipogénica. Este hecho limita el desarrollo de herramientas terapéuticas para abordar, entre otros, el crecimiento anómalo del hueso.

Por lo tanto, en este trabajo nos propusimos desarrollar un método in vitro mejorado para estudiar la regulación del balance entre osteoblastogénesis y adipogénesis a partir de MSCs. Utilizando este conocimiento buscamos identificar los mecanismos íntimos de la regulación de la osteoblastogénesis, con el objetivo de desarrollar nuevas herramientas terapéuticas específicamente dirigidas al crecimiento anómalo de hueso y su potencial aplicación clínica.

Respecto a los protocolos disponibles para el estudio del balance osteoblasto-adipocito in vitro, cabe destacar que la composición de los medios de diferenciación adipogénica presenta mucha variabilidad a pesar de que existan algunos elementos comunes (342–346). Acorde con esto, la suplementación de los elementos más comunes de los protocolos descritos en

la literatura con IGF1, un factor proadipogénico potenciador del proceso (19) resultó en un medio que generó una inducción más fuerte y reproducible de la adipogénesis. La composición de los medios osteoblastogénicos, al contrario, se mantenía constante en la literatura (342,343,347). A pesar de que se sabe que ciertos compuestos, como las BMPs, inducen y promueven este proceso (348–350), no se utilizaron en la composición del medio para evitar enmascarar cambios potenciales durante el proceso. La comparación de los medios propios de diferenciación con medios comerciales en MSCs primarias humanas reveló un mejor perfil de inducción de la expresión de los genes marcadores de diferenciación siendo los medios propios más baratos, fiables y eficaces que los comerciales. De hecho, la combinación de los medios propios de diferenciación con los protocolos estándar de diferenciación facilitó la detección de cambios proadipogénicos descritos en la literatura para células precursoras de osteoblastos primarios de pacientes envejecidos (351). Igualmente, se identificó una peor diferenciación osteoblástica en estas células, concordando así con su origen a partir de muestras óseas de mujeres postmenopáusicas (352).

Interesantemente estos datos no solo evidenciaron la sensibilidad de nuestro protocolo de diferenciación a los cambios en el equilibrio osteoblasto-adipocito de un tipo celular concreto, sino que también confirmaron que las células de donantes de edad avanzada no son un modelo adecuado con el que trabajar en este campo. Por ello, en este trabajo sugerimos que el uso de MSCs para estudiar este equilibrio se debe limitar a células de donantes jóvenes. No obstante, estas células son difíciles de conseguir y tienen un alto coste económico. Por ello, y con el fin de evitar el uso de MSCs primarias, se buscó una línea celular que se pudiese diferenciar a ambas estirpes. Los estudios de transcripción realizados evidenciaron que la línea celular C3H10T1/2 fue la más eficiente para este fin. Sorprendentemente, la diferenciación de esta línea celular de ratón a osteoblasto fue incluso más efectiva que la de la línea preosteoblástica SaOS2 (datos no mostrados), descrita como una de las más semejantes a osteoblastos primarios humanos (314).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En consecuencia, sugerimos el uso de la línea C3H10T1/2 como un modelo celular óptimo para estudiar el equilibrio entre la diferenciación osteoblástica y la adipocítica. A pesar de esto, es evidente que el uso de una línea celular de

ratón puede limitar la validez de los datos obtenidos en humanos. Si bien es cierto que el uso de la línea C3H10T1/2 puede reducir el uso de MSCs humanas primarias, así como proporcionar una aproximación inicial adecuada previa al estudio del balance osteoblasto-adipocito en un contexto humano.

Aunque se ha demostrado la pérdida de la homeostasis del equilibrio entre osteoblastogénesis y adipogénesis en la fisiopatología de numerosas enfermedades, la comprensión de estos dos procesos es desigual. La diferenciación de MSCs a adipocitos es un proceso mucho más estudiado que la diferenciación a osteoblasto. De hecho, aunque el estudio de la metilación se ha sugerido como un abordaje para entender este balance (304,305), existe poco conocimiento del mecanismo de regulación epigenética durante la osteoblastogénesis.

En un trabajo previo del grupo (en revisión), se ha demostrado que existe un cambio en el estado de metilación de los lugares de unión de determinados FTx entre las MSCs y su diferenciación osteoblástica durante 21 días. Es en este último estado diferenciado en el que se estableció una correlación entre la metilación del ADN y la expresión de diversos genes solapantes con estas metilaciones. Estos cambios en el perfil epigenético también permitieron identificar una lista de FTx potencialmente implicados en el equilibrio entre las diferenciaciones a osteoblasto y adipocito de MSCs. De este modo, se evidenció que la metilación del ADN afectaba de manera diferencial a las regiones de unión de diferentes FTx.

Con el fin de validar el papel de los FTx en la osteoblastogénesis se midió el perfil de expresión de estos FTx en tejidos óseos de diversos orígenes para garantizar, en un contexto óseo heterogéneo, un comportamiento denominador común. Para poder extrapolar los datos obtenidos en MSCs diferenciadas durante 21 días a osteoblasto, se tomaron tejidos óseos maduros como referencia para determinar su expresión y su relación con los genes marcadores de osteoblastogénesis y adipogénesis. Aunque es cierto que el osteocito representa el 95% de la celularidad ósea y se les podrían atribuir los resultados obtenidos, el osteoblasto es la célula más metabólicamente activa de este tejido. Además, los osteocitos representan el último estadio de la diferenciación

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

osteoblástica, compartiendo así ambos tipos celulares su origen y parte de su perfil de expresión génica.

En el tejido óseo, el perfil de metilación de las zonas de unión de los FTx se relacionó con una mayor o menor expresión de estos. Concretamente, aquellos FTx con los lugares de acción hipermetilados se expresaron menos en hueso. Este comportamiento sugiere la existencia de un doble mecanismo de regulación de algunos FTx. Por un lado, se regula la magnitud de su expresión y por otro lado su acción, regulando así su unión al ADN a través de la metilación de sus lugares de unión. De este modo la expresión de los FTx con sus lugares de unión hipermetilados podría ser regulada en el proceso osteoblastogénico. Es más, esta regulación podría estar relacionada con su implicación en el equilibrio osteoblasto-adipocito. Interesantemente, la expresión de los FTx estudiados en el tejido graso articular fue independiente del estado de metilación. Apoyando este dato, en estudios previos del grupo (en revisión) no se identificaron cambios significativos en el estado de metilación al diferenciar hMSCs a adipocito durante 21 días. Concordando con esto, se ha demostrado que la metilación del ADN en genes promotores adipogénicos no estaba relacionada ni con su potencial expresión génica ni con su perfil transcriptómico en este proceso de diferenciación (353). Es más, se ha descrito que durante este proceso el perfil de metilación del ADN se mantiene constante, lo que sugiere que, al contrario que para la osteoblastogénesis, su relevancia no es determinante durante la diferenciación adipogénica (354). No obstante, otros trabajos con 5-aza-2'-deoxicitidina han establecido que su acción desmetilante es crucial, en estadios tempranos, para una correcta diferenciación de preadipocitos 3T3-L1 (306). A pesar de ello, trabajos previos de nuestro grupo (en revisión) han establecido que una diferenciación exitosa de MSCs a adipocitos no requiere modificaciones significativas del perfil de metilación de las células de origen. En línea con esta afirmación existen estudios que sugieren que el balance osteoblasto-adipocito no es tan igualitario o simétrico como se suponía en origen (355–358). Se ha descrito que las MSCs, independientemente de su origen tisular, tienen más predisposición a un destino celular que a otro (355–358). Las divergencias observadas en el perfil de modificación epigenético apoyan la hipótesis de que la adipogénesis necesita

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

menos modulación epigenética y mecanismos regulatorios que la osteoblastogénesis. Integrando esto con el conocimiento existente acerca de la oposición entre ambos destinos celulares, se verifica que, para modular este balance, sería suficiente actuar sobre uno u otro de los brazos del equilibrio para alterar el resultado final del proceso de diferenciación.

En los tejidos estudiados todos los FTx vinculados a la modificación epigenética de la osteoblastogénesis mostraron un mayor número de correlaciones negativas con los marcadores de este proceso, independientemente del estado de metilación de sus lugares de unión. Dada la potencial doble regulación sobre los FTx vinculados a la hipermetilación de sus lugares de unión, consideramos a éstos como los más importantes a la hora de estudiar la regulación del balance osteoblasto-adipocito. Dentro de los FTx seleccionados la distribución de las correlaciones ($p<0,05$, $r>0,5$, $r<-0,5$) con los marcadores de adipogénesis y de osteoblastogénesis fue muy desigual. Concretamente, se observaron muchas más correlaciones para los primeros que para los segundos. Este dato establece un vínculo entre los marcadores adipogénicos y los FTx asociados a la hipermetilación de sus lugares de acción durante la osteoblastogénesis.

Analizando el número de correlaciones entre ellos, las diferencias de expresión entre el tejido óseo y el adiposo, y su RRF, los resultados obtenidos permitieron la acotación de un conjunto de FTx (nodo) potencialmente implicados en la regulación del equilibrio osteoblasto-adipocito de forma colaborativa. Para estudiar esta implicación se evaluó la expresión de este nodo en un modelo *in vitro*. La expresión de este conjunto de FTx aumentó, en general, durante la osteoblastogénesis de células de ratón (C3H10T1/2). Este dato podría entrar en contraposición con lo observado hasta el momento en tejido óseo y adiposo humanos. Se sabe que las diferencias entre los perfiles epigenéticos en humano y ratón se conservan no solo entre especies sino también tisularmente, siendo mayores las diferencias entre tejidos dentro de la misma especie que las divergencias entre especies en un mismo tejido (359). Como hemos indicado previamente en la sección de resultados, los lugares de acción de todos los FTx estudiados se encuentran, netamente, más hipometilados que hipermetilados. Al mismo tiempo, se sabe que los FTx

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

integran las señales del ambiente en la expresión del ADN, por ello, no es común que presenten un único papel. Considerando estos hechos, el aumento de su expresión durante la osteoblastogénesis en ratón pudo ser debido a otras funciones que sucedan de forma paralela. Es probable que, en este proceso concreto y en la línea C3H10T1/2 sean necesarios para más funciones, lo que puede justificar las diferencias observadas.

En búsqueda de la causalidad que justifique la implicación de estos FTx en el equilibrio osteoblastogénesis-adipogénesis, silenciamos aquellos pertenecientes al nodo en ambos procesos de diferenciación. El silenciamiento de los FTx de forma individual no provocó grandes cambios en la regulación del equilibrio osteoblasto-adipocito. Concretamente, el silenciamiento de NRF1 provocó un aumento de la expresión de ALPL. Pese a este efecto discreto sobre el balance osteoblasto-adipocito, se ha descrito que el papel principal del FTx NRF1 en la biogénesis mitocondrial (360) está regulado por el coactivador 1 de PPARG (361). Curiosamente, este FTx ha sido propuesto como marcador de grasa parda (362). Simultáneamente, NRF1 también se ha relacionado con el promotor del marcador génico osteoblástico osterix (OSX) en ratón debido a su acción como elemento de respuesta antioxidante (363), así como con una regulación positiva de la osteoclastogénesis mediada por RANKL (364). Estos papeles opuestos apoyan su implicación en el balance osteoblasto-adipocito.

De forma semejante, el silenciamiento de SAP30 no afectó al equilibrio entre osteoblastogénesis y adipogénesis. Aunque para este FTx no se han descrito implicaciones en ninguno de los dos procesos de diferenciación, o relación con ambos destinos celulares, sí existe literatura para SIN3A. SAP30 forma parte del complejo deacetilante de histonas, donde se encuentra también SIN3A (365). Este FTx ejerce su acción a través de otras proteínas (como SAP30) puesto que no tiene interacción directa con el ADN. Su función en los procesos implicados en el balance osteoblasto-adipocito no está clara. Aunque se ha relacionado con la vía WNT en la diferenciación neuronal (366) y con el bloqueo de CEBPA a través de CEBPB (367), también se ha descrito que, formando parte de un complejo represor, permite el efecto proadipogénico del factor 1 de unión a IST (FBI1) (332).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En el caso específico del silenciamiento de SETDB1, se modularon las expresiones de SPP1, ADIPOQ y PPARG. Este FTx es una lisina-metiltransferasa encargada de la trimetilación de la lisina 9 en la histona 3 del ADN (H3K9me3) (368). Su relación con PPARG ha sido descrita en numerosas ocasiones (25,369–371). SETDB1 mantiene la expresión de PPARG en un nivel bajo pero, simultáneamente, mantiene el promotor del gen preparado para el momento de inicio de la diferenciación adipogénica (369). La expresión de este FTx está altamente ligada a los dominios bivalentes. Éstos son zonas donde existen metilaciones en la lisina 4 (H3K4me), típica de la eucromatina (cromatina activa), y en la lisina 27 de la histona 3 (H3K27me3), típica de la heterocromatina (cromatina silente). Cuando se silencia SETDB1 estos dominios quedan accesibles, permitiendo de esta forma el desarrollo de los procesos de diferenciación de células precursoras (369,372). Dado que en esta situación no existe correlación entre los cambios de metilación en los promotores de los genes y sus cambios en los perfiles génicos de expresión (372), al igual que sucede en la adipogénesis, donde la metilación no juega un papel relevante (353), el papel de SETDB1 en el proceso adipogénico podría no ser tan relevante como cabría esperar. De la misma forma, y considerando la hipótesis de que la adipogénesis es un proceso menos controlado epigenéticamente que la osteoblastogénesis, la relación entre SETDB1 y los dominios bivalentes podría explicar el descenso de PPARG al silenciar este FTx.

El silenciamiento de SP4 en nuestros experimentos disminuyó la expresión de FABP4 y PPARG en diferenciaciones adipocíticas, y aumentó la expresión de RUNX2 en diferenciaciones osteoblásticas. Al igual que para SAP30, no existe literatura que relacione a este FTx con los adipocitos, los osteoblastos, o sus procesos de diferenciación. La expresión de SP4 es altamente tejido-específica, siendo expresado en mayor medida en el cerebro (373). Interesantemente, se ha relacionado con el marcador adipogénico PPARG en líneas celulares de cáncer para activar p21 (374), sugiriendo así una posible implicación con este gen en la adipogénesis.

Al silenciar la expresión de SUZ12 se produjo un incremento en la expresión de RUNX2. SUZ12 pertenece, junto a EZH2, al complejo represor

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

del polycomb de tipo 2 (PCR2 por sus siglas en inglés). Este complejo se encarga de la metilación de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27me3). Aunque se sabe su implicación en la heterocromatina, el papel de esta metilación en la diferenciación osteogénica no es relevante (375). En concreto, se han descrito efectos osteoprotectores y proosteoblastogénicos tras el silenciamiento de EZH2 (376,377). Interesantemente, se ha visto que el compuesto proosteoblastogénico α-cetoglutarato desciende la cantidad de H3K27me3 y H3K9me3 en el promotor de BMP2 (378), implicando de esta forma ambas metilaciones en la regulación del equilibrio osteoblasto-adipocito.

El silenciamiento de ZEB1 en este modelo celular provocó un descenso en la expresión de FABP4 y PPARG durante la adipogénesis. ZEB1 se ha relacionado tanto con la adipogénesis en ratones como con el desarrollo de la obesidad en humanos (329,379). No obstante, también se ha descrito un papel para este FTx en eventos relacionados con el hueso, como la expresión de ALPL mediada por BMP2 (380) o anormalidades óseas en ratones con ZEB1 silenciado (381). Es relevante sin embargo el hecho de que la funcionalidad de la proteína ZEB1 sea altamente dependiente de su contexto celular, y esté sujeta al equilibrio entre ZEB1 y ZEB2 (380,382,383). Por ello, los mecanismos compensatorios podrían enmascarar la implicación de ZEB1 en la regulación del equilibrio osteoblasto-adipocito.

La regulación de aquellos procesos que son importantes para el normal desarrollo de la vida, como la ingesta, por ejemplo, acostumbra a ser redundante en el cuerpo humano, y posee una o varias copias de seguridad que permiten minimizar posibles daños en alguno de los elementos reguladores. Asumiendo este hecho, viendo el efecto discreto de la inhibición individual de los FTx, y considerando el potencial trabajo colaborativo de los FTx del nodo, nos planteamos un silenciamiento colectivo con el fin de evitar en la medida de lo posible los mecanismos compensatorios entre la propia red de FTx. El hecho de que el silenciamiento conjunto del nodo disminuyese la expresión de los marcadores de diferenciación adipogénica, en osteoblastogénesis y adipogénesis, sugirió su implicación en el proceso de diferenciación mesenquimal. Asumiendo también el cambio de paradigma expuesto previamente, aunque no se evidenciaran cambios significativos en la expresión

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de los marcadores osteoblásticos, el hecho de inhibir la diferenciación menos regulada y epigenéticamente más espontánea se consideró suficiente para desplazar el equilibrio osteoblasto-adipocito.

Con el fin de contextualizar el nodo y su mecanismo de acción investigamos su estado de expresión en muestras óseas patológicas y pudimos observar ciertos patrones en su comportamiento. Aunque no se observó un dimorfismo sexual al considerar los FTx de forma individual, analizando de forma conjunta la correlación entre la expresión de los FTx del nodo y la edad de los pacientes segregada por sexos se observó una diferencia en el signo de la pendiente para estas correlaciones. A pesar de no ser significativa, se apreció una tendencia semejante con los marcadores de diferenciación adipogénica. En hombres la pendiente positiva implicaba un aumento de la expresión de los FTx del nodo con la edad, manteniéndose más constante en mujeres. Concordando con este hecho, se sabe que las mujeres presentan una adiposidad corporal mayor que los hombres durante toda su vida, no obstante, en lo relativo al peso y al IMC, hay más hombres con niveles considerados patológicos que mujeres (384). También es cierto que la mayor pérdida de fenotipo óseo en mujeres tiene lugar durante la menopausia y se estabiliza posteriormente, siendo más constante en los hombres. Estas diferencias podrían explicar las diversas correlaciones del nodo en hombres y mujeres. Una de las limitaciones de esta tesis es que, dadas las características de las muestras analizadas, es posible que el aumento de marcadores en mujeres se hubiera producido en edades previas. Con la obtención de muestras de un rango de edad más amplio sería posible confirmar esta hipótesis, así como la implicación del nodo en el envejecimiento.

La relación entre los FTx y el peso también se evidenció con la relación entre la expresión del nodo y el aumento del IMC. Para algunos de estos FTx, como ZEB1, ya se había descrito su relación con la obesidad (379). La relación entre la expresión de FTx y el IMC confirma que el aumento de peso asociado a esta patología no solo afecta al tejido graso sino también al óseo. Igualmente, esto sugiere la implicación del nodo de FTx en la adiposidad ósea a través de la regulación del equilibrio osteoblasto-adipocito, inclinando la balanza hacia la adipogénesis.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Una de las patologías donde el equilibrio osteoblastogénesis-adipogénesis se encuentra alterado es la OH. Kaplan et al. establecieron cuatro abordajes para la prevención y tratamiento de la OH: regulación de las vías de señalización implicadas, control de la inflamación asociada, modulación de los osteoprogenitores en los tejidos donde ocurre la osificación y control del ambiente que favorece este proceso (191). Teniendo en cuenta estas claves, diseñamos una triterapia con el fin de abarcarlas todas, buscando así el control del crecimiento óseo anormal asociado a la OH. En ella se incluyeron las tiazolidinedionas (rosiglitazona o pioglitazona), antidiabéticos orales agonistas de PPARG (385), y dos antiinflamatorios. Se ha descrito que los antiinflamatorios, esteroideos o no, afectan a la correcta diferenciación osteoblástica de MSCs (195,386). Debido a esto, se seleccionó la dexametasona como corticoide, y la indometacina como antiinflamatorio no esteroideo. Interesantemente, este fármaco también posee afinidad por PPARG (386) y se ha empleado previamente en el tratamiento de la OH (208,209).

La combinación de pioglitazona, dexametasona e indometacina fue capaz de alterar de forma sinérgica la regulación del equilibrio entre osteoblastogénesis y adipogénesis independientemente del destino celular, empujándolo hacia un perfil más adipogénico. Considerando la hipótesis de que la adipogénesis sea un proceso más espontáneo que la osteoblastogénesis (355–358), su promoción se podría considerar más relevante que la propia inhibición de la osteoblastogénesis a la hora de modular el equilibrio. Interesantemente, en células preosteoblásticas primarias la triterapia no solo fue capaz de aumentar la expresión de los genes marcadores de adipogénesis, sino que mantuvo un efecto semejante en la expresión de los FTx del nodo. Sabiendo que la inhibición simultánea de estos FTx resulta en una inhibición de la adipogénesis, este aumento apoya el potencial de la triterapia para orientar la diferenciación de MSC hacia adipocito, independientemente del ambiente celular, en situaciones de crecimiento anómalo del hueso, como la OH.

Tras la oportunidad de trabajar en un caso clínico de HOP (340), se planteó el empleo de la triterapia propuesta como prevención de recidivas post-exéresis de placas de osificación. Se descartó un tratamiento individual con antiinflamatorios (esteroideos o no esteroideos) porque ya se habían utilizado

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

en periodos anteriores sin resultados significativos. Previa administración al paciente se realizó una biovalidación de la terapia en células preosteoblásticas de OH adquirida y en un cultivo celular de preosteoblastos del paciente. Como se ha descrito previamente (288) y se ha observado en la clínica de este caso, las osificaciones surgen en tejidos blandos, en un ambiente subcutáneo e infiltradas en tejido adiposo. Por ello, el estudio de biovalidación de la triterapia en células primarias de osificación se realizó en un ambiente proadipogénico más semejante al fisiológico. Los resultados no fueron tan determinantes como en el caso de las células primarias hueso esquelético. Este hecho se puede explicar por el mayor potencial osteogénico de las células de OH (387). No obstante, y a pesar de este hecho, la triterapia aumentó la expresión de los marcadores de adipogénesis, facilitando de esta forma la diferenciación de MSCs más espontánea. Una vez realizada la validación de la triterapia, su administración clínica confirmó también un efecto sobre el equilibrio entre la función de osteoblastos y osteoclastos. La ruptura del equilibrio entre los dos marcadores clínicos de remodelado óseo (70) confirmó que la triterapia propuesta para el tratamiento y la prevención de la OH no solo controlaba los cuatro puntos clave propuestos por Kaplan et al. (191), sino que iba un paso más allá orientando el remodelado óseo hacia la resorción.

Ante la falta de un protocolo optimizado que permita estudiar el balance entre la diferenciación osteoblástica y la adipogénica desde su origen mesenquimal común en este trabajo se estableció un modelo de diferenciación in vitro con C3H10T1/2. Este modelo nos permitió identificar el mecanismo de acción de un nodo de FTx implicados en el control del equilibrio osteoblasto-adipocito. Este nodo se relacionó también con el envejecimiento y con la obesidad y la adiposidad ósea asociada a estas situaciones fisiopatológicas. La modulación de los marcadores genéticos de osteoblastogénesis y adipogénesis, así como del nodo, permitió identificar una triterapia para la prevención y el tratamiento del crecimiento anormal del hueso. Esta terapia se biovalidó in vitro y en un caso clínico con resultados prometedores, siendo un ensayo clínico el siguiente paso, previo a su indicación farmacológica.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CONCLUSIONES

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CONCLUSIONES

- La línea celular C3H10T1/2, junto con los medios de diferenciación desarrollados en este trabajo, proporciona un modelo de diferenciación óptimo para el estudio del balance entre las diferenciaciones osteoblástica y adipocítica.
- Los factores de transcripción asociados a la hipermetilación de sus lugares de acción ejercen un efecto perjudicial para el proceso de osteoblastogénesis.
- Los factores de transcripción NRF1, SAP30, SETDB1, SP4, SUZ12 y ZEB1 ejercen su efecto sobre el equilibrio osteoblastogénesis-adipogénesis de forma coordinada.
- El efecto del nodo de factores de transcripción es esencial para una correcta adipogénesis y tiene efectos deletéreos sobre el proceso osteoblastogénesis.
- La expresión conjunta del nodo de factores de transcripción del nodo está relacionada con un aumento del IMC y, por tanto, con la adiposidad ósea asociada.
- La triterapia formada por tiazolidinedionas, dexametasona e indometacina promueve la adipogénesis e inhibe la osteoblastogénesis, postulándose como un nuevo tratamiento para la prevención y el tratamiento de la osificación heterotópica, y siendo probada en un caso de heteroplasia ósea progresiva.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CONCLUSIONS

- C3H10T1/2 cell line, along with the media developed in this work, provides an optimum model to study osteoblastic and adipogenic differentiations balance.
- Transcription factors associated with their binding-sites hipermetilation impair osteoblastogenesis.
- NRF1, SAP30, SETDB1, SP4, SUZ12, and ZEB1 transcription factors exert their effect on osteoblast-adipocyte balance in a coordinated manner.
- Transcription factors node effect is essential to a successful adipogenesis and impairs osteoblastogenesis.
- Combined node expression is related to an IMC increase and, therefore, with the associated bone adiposity.
- Combination of thiazolidinediones, dexamethasone and indomethacin as a tritherapy promotes adipogenesis and inhibits osteoblastogenesis. It is proposed as a new treatment to prevent and treat heterotopic ossification, and it has been evaluated in a clinical case of progressive osseous heteroplasia.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ANEXOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ÍNDICE DE ANEXOS

Índice de figuras
Índice de tablas
Listado de abreviaturas
Dictado del comité de ética

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del hueso maduro. 8
Figura 2. Estructura de una osteona 9
Figura 3. Fases del remodelado óseo 18
Figura 4. Estructura molecular de un corticosteroide 28
Figura 5. Composición del medio adipogénico consenso 68
Figura 6. Diferenciación adipogénica con medio consenso y medio propio 70
Figura 7. Comparación entre medios de diferenciación comerciales y medios propios de diferenciación 74
Figura 8. Diferenciación osteoblástica y adipogénica de células preosteoblásticas 77
Figura 9. Diferenciación osteoblástica de líneas celulares de MSC 81
Figura 10. Diferenciación adipogénica de líneas celulares de MSC 83
Figura 11. RRF de los FTx potencialmente implicados en la osteoblastogénesis 86
Figura 12. Mapa de calor de la expresión de los factores de transcripción seleccionados, marcadores de diferenciación osteoblástica y adipocítica en muestras humanas de hueso 89
Figura 13. Mapa de calor de la expresión de los factores de transcripción seleccionados, marcadores de diferenciación osteoblástica y adipocítica en muestras humanas de grasa infrapatelar 90
Figura 14. Correlaciones entre los FTx y los marcadores de diferenciación osteoblástica y adipocítica 92
Figura 15. Relación de la expresión de una selección de FTx en hueso y grasa 94
Figura 16. Expresión de los factores de transcripción del nodo en la osteoblastogénesis y la adipogénesis 95
Figura 17. Silenciamiento de NRF1 en C3H10T1/2 96
Figura 18. Silenciamiento de NRF1 en C3H10T1/2 98
Figura 19. Silenciamiento de SAP30 en C3H10T1/2 99
Figura 20. Silenciamiento de SAP30 en C3H10T1/2 101
Figura 21. Silenciamiento de SETDB1 en C3H10T1/2 102
Figura 22. Silenciamiento de SETDB1 en C3H10T1/2 104
Figura 23. Silenciamiento de SP4 en C3H10T1/2 105
Figura 24. Silenciamiento de SP4 en C3H10T1/ 107
Figura 25. Silenciamiento de SUZ12 en C3H10T1/2 108

Figura 26. Silenciamiento de SUZ12 en C3H10T1/2 110
Figura 27. Silenciamiento de ZEB1 en C3H10T1/2 111
Figura 28. Silenciamiento de ZEB1 en C3H10T1/2 113
Figura 29. Silenciamiento del nodo en C3H10T1/2 115
Figura 30. Silenciamiento del nodo en C3H10T1/2 119
Figura 31. Expresión de NRF1 en hueso en diferentes condiciones fisiopatológicas 122
Figura 32. Expresión de SAP30 en hueso en diferentes condiciones fisiopatológicas 124
Figura 33. Expresión de SETDB1 en hueso en diferentes condiciones fisiopatológicas 127
Figura 34. Expresión de SP4 en hueso en diferentes condiciones fisiopatológicas 129
Figura 35. Expresión de SUZ12 en hueso en diferentes condiciones fisiopatológicas 132
Figura 36. Expresión de ZEB1 en hueso en diferentes condiciones fisiopatológicas 134
Figura 37. Relación del conjunto del nodo con las condiciones fisiopatológicas 136
Figura 38. Crecimiento de hOB en diferentes ambientes 138
Figura 39. Bloqueo de la vía WNT por parte de las tiazolidinedionas 140
Figura 40. Efecto de la triterapia sobre C3H10T1/2 en un ambiente proadipogénico 144
Figura 41. Efecto de la triterapia sobre C3H10T1/2 en un ambiente proosteoblástico 146
Figura 42. Efecto de la triterapia sobre SaOS2 en un ambiente proosteoblastogénico 149
Figura 43. Efecto de la triterapia sobre hOB en un ambiente proosteoblastogénico 153
Figura 44. Placa de osificación heterotópica 155
Figura 45. Efecto de la triterapia sobre hOH de OH adquirida en un ambiente proadipogénico 157
Figura 46. Efecto de la triterapia sobre hOH de OH congénita en un ambiente proadipogénico 159
Figura 47. Efecto de la administración sistémica de la triterapia en un caso clínico de heteroplasia ósea progresiva 161

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 1. Reguladores del remodelado óseo a nivel local 18
Tabla 2. Marcadores de remodelado óseo 19
Tabla 3. Diferenciación celular a adipocito y osteoblasto. 52
Tabla 4. Tratamientos celulares y concentraciones 53
Tabla 5. Referencia de los cebadores de humano usados para PCR en tiempo real. 58
Tabla 6. Referencia de los cebadores de ratón usados para PCR en tiempo real. 59

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

AD	adipogénico
ADIPOQ	adiponectina
AINEs	antiinflamatorios no esteroideos
ALPL	fosfatasa alcalina
BGLAP	osteocalcina
BIO	6-bromoindirubin-3-oxim
BMPs	proteínas morfogénicas del hueso
CEBPA	proteína α de unión a CCAAT/promotor
Col I	colágeno I
COX	ciclooxigenasa
CpG	dinucleótido
CTBP2	proteína 2 de unión C-terminal
CTX-I	telopéptido reticulante C-terminal del Col I
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DKK1	dickkopf1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EZH2	potenciador del homólogo zeste 2
FABP4	proteína ligante a ácidos grasos
FBS	suero fetal bovino
FGF	factor de crecimiento fibroblástico
FGF23	factor de crecimiento fibroblástico 23
FOP	fibrodisplasia osificante progresiva
FTx	factores de transcripción
GPNMB	osteoactivina
hMSC	células madre mesenquimales humanas
hOB	células tipo preosteoblasto primarias
HOP	heteroplasia ósea progresiva
HPRT	hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa
IBMX	isobutilmetilxantina
IGF1	factor de crecimiento insulínico 1
IGF2	factor de crecimiento insulínico 2
IL1	interleucina 1
IL6	interleucina 6
IMC	índice de masa corporal
LCN2	lipocalina tipo 2
MAFK	FTx K MAF BZIP
M-CSF	factor estimulador de colonias de macrófagos
MMPs	metaloproteinasas
MSCs	células madre mesenquimales
NFYA	subunidad α del FTx nuclear Y
NRF1	factor de respiración nuclear 1
OB	osteoblastogénico

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

OH	osificación heterotópica
OH hOB	osteoblastos primarios de OH
OPG	osteoprotegerina
PBS	tampón fosfato salino
PBX3	homeobox 3 PBX
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas
PLIN2	perilipina 2
PNPI	propéptido de extensión N-terminal del Col I
PPARG	receptor γ activante de la proliferación de peroxisomas
PTH	hormona paratiroidea
RANKL	ligando del factor nuclear κβ
RRF	relevancia relativa de cada FTx
RT	retrotranscripción
RUNX2	factor de trasncripción relacionado con RUNT tipo 2
SAP30	proteína de 30kDa asociada a SIN3A
SETDB1	histona-lisina N-metiltransferasa SETDB1
SIN3A	miembro A de la familia de FTx SIN3
siRNA	ARN pequeños interferentes
SMARCC1	subunidad SMARCC1 del complejo SWI/SNF
SP4	factor de transcripción SP4
SPP1	osteopontina
SREBP1	factor de transcripción 1 de unión de elementos reguladores de esterol
STAT3	transductor de señal y activador de la transcripción 3
SUZ12	subunidad SUZ12 del complejo de represión del polycomb
TERT	transcriptasa reversa de la telomerasa humana
TFGβ	factor de crecimiento transformante-β
TNF	factor de necrosis tumoral
VEGF	factor de crecimiento del endotelio vascular
WNT	vía Wingless/INT
ZEB1	homeobox 1 de unión al E-boxing
ZNF143	dedo de zinc 143

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE
Secretaría Xeral Técnica

SERVIZO GALEGO de SAÚDE | Xerencia do Servizo Galego de Saúde

galicia

DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO

Ana Estany Gestal, Secretaria del Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo,

CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 20 de abril de 2021 la modificación del estudio:

Título: Estudio de los factores de transcripción asociados a los cambios en la metilación del ADN durante la osteoblastogénesis y su papel en la diferenciación del osteoblasto
Versión modificación: adenda al protocolo: procolo versión 1.0 en fecha/07/2015
Promotor/a: Rodolfo Gómez Vahamonde
Investigador/a: Rodolfo Gómez Vahamonde
Código de Registro: 2016/258

Y que este Comité acepta de conformidad con sus procedimientos normalizados de trabajo y tomando en cuenta los requisitos éticos, metodológicos y legales exigibles a los estudios de investigación con seres humanos, sus muestras o registros, que dicha modificación sea incorporada al estudio de investigación mencionado.

Documento asinado dixitalmente por:
Ana Estany Gestal (30/04/2021 10:28)
https://sede.xunta.gal/cve?idcve=SAOC-J4G4-BOAH-OF4O-TN12-SLF0-04LH-F161-9771-3351-10

NOTA: Se le recuerda que en el caso de que en este estudio se recluten pacientes, el equipo investigador debe tener disponible el Documento de Consentimiento Informado (Hojas de Información y Hojas de Firma) tanto en *galego* como en castellano en el momento de comenzar el reclutamiento.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
Xacobeo 2021

Y HACE CONSTAR QUE:

1.- El Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo cumple tanto en su composición como en sus PNTs los requisitos legales vigentes.

2.- La composición actual del Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo es:

Vicepresidenta
Pilar Rodríguez Ledo. Médico especialista en Medicina Familiar y Comunitaria.

Secretaria
Ana Estany Gestal. Licenciada en Farmacia.

Vicesecretaria
María Mercedes Rodicio García. Médico especialista en Pediatría.

Vocales
Francisco Campos Pérez. Licenciado en Biología.
Catalina Caamaño Isorna. Farmacéutica de Atención Primaria.
Jesús Fernández Álvarez. Miembro lego.
Ricardo García Martínez. Licenciado en Derecho.
Jesús Prego Domínguez. Enfermero.
Lorenzo Armenteros del Olmo. Médico especialista en Medicina Familiar y Comunitaria.
Eva Marcos Doldán. Analista-programadora.
Carlos Rodríguez Moreno. Médico especialista en Farmacología Clínica.

Para que conste donde proceda, y a petición de quien proceda, en Santiago de Compostela,
La Secretaria del Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago Lugo,

Documento asinado dixitalmente por:
Ana Estany Gestal (30/04/2021 10:28)
https://sede.xunta.gal/cve?idcve=SAOC-J4G4-BOAH-OF4O-TN12-5LF0-04LH-F161-9771-3351-10

BIBLIOGRAFÍA

1. Buck DW, Dumanian GA. Bone biology and physiology: Part I. the fundamentals. Plast Reconstr Surg. 2012;129(6):1314–20.
2. Cantón MC-M, Alañón FM. Tejido óseo. In: Tejido OSEO - Características principales, componentes, células principales e histogénesis. p. 1–4.
3. Kini U, Nandeesh BN. Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism. Radionucl Hybrid Bone Imaging [Internet]. 2012 Oct 1 [cited 2022 Apr 17];9783642024009:29–57. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-02400-9_2
4. Eriksen EF, Axelrod DW, Melsen F. Bone histomorphometry. An official publication of the American Society for Bone and Mineral Research [Internet]. Lippincott, Williams and Wilkins.; 1994 [cited 2022 Apr 17]. Available from: https://books.google.com/books/about/Bone_Histomorphometry.html?id=4PdnQgAACAAJ
5. F N. Musculoskeletal system Part I Anatomy, physiology, and metabolic disorders [print] : a compilation of paintings. 1987. 260 p.
6. Brodsky B, Persikov A V. Molecular structure of the collagen triple helix. Adv Protein Chem [Internet]. 2005 [cited 2022 Apr 17];70:301–39. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15837519/
7. Freemont AJ. Basic bone cell biology. Int J Exp Pathol [Internet]. 1993;74(4):411–6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8398815%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2001858
8. Clarke B. Normal Bone Anatomy and Physiology The Skeleton. Clin J Am Soc Nephrol. 2008;3:131–9.
9. Mackie EJ. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. Int J Biochem Cell Biol [Internet]. 2003 Sep 1 [cited 2022 Apr 17];35(9):1301–5. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12798343/
10. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. Annu Rev Cell Dev Biol [Internet]. 2004 [cited 2022 Apr 17];20:781–810. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15473860/
11. Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA, et al. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. N Engl J Med [Internet]. 2002 May 16 [cited 2022 Apr 17];346(20):1513–21. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12015390/
12. RD L, RR R, ML J. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. N Engl J Med [Internet]. 2002 Sep 19 [cited 2022 Apr 17];347(12):943–4. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12239268/
13. Justesen J, Stenderup K, Ebbesen EN, Mosekilde L, Steiniche T, Kassem M. Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. Biogerontology [Internet]. 2001 [cited 2020 Sep 24];2(3):165–71. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11708718/
14. Rosen CJ, Bouxsein ML. Mechanisms of disease: is osteoporosis the obesity of bone? Nat Clin Pract Rheumatol [Internet]. 2006 Jan [cited 2016 Oct 17];2(1):35–43. Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ncprheum0070
15. Atashi F, Modarressi A, Pepper MS. The Role of Reactive Oxygen Species in Mesenchymal Stem Cell Adipogenic and Osteogenic Differentiation: A Review. Stem Cells Dev [Internet]. 2015 May 15 [cited 2018 Jun 14];24(10):1150–63. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25603196
16. Moerman EJ, Teng K, Lipschitz DA, Lecka-Czernik B. Aging activates adipogenic

and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: the role of PPAR-γ 2 transcription factor and TGF-β /BMP signaling pathways. Aging Cell [Internet]. 2004 Dec [cited 2018 Jun 14];3(6):379–89. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15569355

17. Takada I, Kouzmenko AP, Kato S. Molecular switching of osteoblastogenesis versus adipogenesis: Implications for targeted therapies. Expert Opin Ther Targets. 2009;13(5):593–603.
18. Yang D-CC, Tsay H-JJ, Lin S-YY, Chiou S-HH, Li M-JJ, Chang T-JJ, et al. cAMP/PKA Regulates Osteogenesis, Adipogenesis and Ratio of RANKL/OPG mRNA Expression in Mesenchymal Stem Cells by Suppressing Leptin. Hotchin N, editor. 2008 Feb 6 [cited 2018 Jun 14];3(2):e1540. Available from: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0001540
19. Tang Q-Q, Otto TC, Lane MD. Commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2004 Jun 29 [cited 2019 Jul 8];101(26):9607–11. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15210946
20. Sottile V, Seuwen K. Bone morphogenetic protein-2 stimulates adipogenic differentiation of mesenchymal precursor cells in synergy with BRL 49653 (rosiglitazone). FEBS Lett [Internet]. 2000 Jun 23 [cited 2022 Apr 20];475(3):201–4. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10869556/
21. Zur Nieden NI, Kempka G, Rancourt DE, Ahr HJ. Induction of chondro-, osteo- and adipogenesis in embryonic stem cells by bone morphogenetic protein-2: Effect of cofactors on differentiating lineages. BMC Dev Biol [Internet]. 2005 Jan 26 [cited 2022 Apr 20];5(1):1–15. Available from: https://bmcdevbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-213X-5-1
22. Kang Q, Song WX, Luo Q, Tang N, Luo J, Luo X, et al. A comprehensive analysis of the dual roles of BMPs in regulating adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. Stem Cells Dev [Internet]. 2009 May 1 [cited 2022 Apr 20];18(4):545–58. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18616389/
23. Chen G, Deng C, Li YP. TGF-β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. Int J Biol Sci [Internet]. 2012 [cited 2022 Apr 20];8(2):272–88. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22298955/
24. Velasco J, Riancho JA. La vía Wnt y el hueso. Rev Española Enfermedades Metabólicas Óseas [Internet]. 2008 Jan [cited 2018 Feb 20];17(1):5–9. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1132846008711310
25. Takada I, Kouzmenko AP, Kato S. Wnt and PPARγ signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis. Nat Rev Rheumatol [Internet]. 2009 Aug 7 [cited 2018 Jun 14];5(8):442–7. Available from: https://www.nature.com/articles/nrrheum.2009.137
26. Stevens JR, Miranda-Carboni GA, Singer MA, Brugger SM, Lyons KM, Lane TF. Wnt10b deficiency results in age-dependent loss of bone mass and progressive reduction of mesenchymal progenitor cells. J Bone Miner Res [Internet]. 2010 Oct [cited 2022 Apr 20];25(10):2138–47. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20499361/
27. Rharass T, Lucas S. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Bone marrow adiposity and bone, a bad romance? Eur J Endocrinol. 2018;179(4):R165–82.
28. Ross DA, Rao PK, Kadesch T. Dual Roles for the Notch Target Gene Hes-1 in the Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes . Mol Cell Biol [Internet]. 2004 Apr 15 [cited 2022 Apr 20];24(8):3505–13. Available from: https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/MCB.24.8.3505-3513.2004
29. Luo Z, Shang X, Zhang H, Wang G, Massey PA, Barton SR, et al. Notch Signaling in Osteogenesis, Osteoclastogenesis, and Angiogenesis. Am J Pathol [Internet]. 2019

Aug 1 [cited 2022 May 30];189(8):1495. Available from: /pmc/articles/PMC6699068/
30. Shimizu T, Tanaka T, Iso T, Matsui H, Ooyama Y, Kawai-Kowase K, et al. Notch Signaling Pathway Enhances Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2) Responsiveness of Msx2 Gene to Induce Osteogenic Differentiation and Mineralization of Vascular Smooth Muscle Cells. 2011 May 27 [cited 2018 Jun 14];286(21):19138–48. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21471203/
31. Li L, Dong Q, Wang Y, Feng Q, Zhou P, Ou X, et al. Hedgehog signaling is involved in the BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. Int J Mol Med [Internet]. 2015 Jun 1 [cited 2022 Apr 20];35(6):1641–50. Available from: http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2015.2172/abstract
32. Fontaine C, Cousin W, Plaisant M, Dani C, Peraldi P. Hedgehog signaling alters adipocyte maturation of human mesenchymal stem cells. Stem Cells [Internet]. 2008 Apr 1 [cited 2022 Apr 20];26(4):1037–46. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18258719/
33. Kuwahara ST, Liu S, Chareunsouk A, Serowoky M, Mariani F V. On the horizon: Hedgehog signaling to heal broken bones. [cited 2022 May 30]; Available from: https://doi.org/10.1038/s41413-021-00184-8
34. Chen Q, Shou P, Zhang L, Xu C, Zheng C, Han Y, et al. An osteopontin-integrin interaction plays a critical role in directing adipogenesis and osteogenesis by mesenchymal stem cells. Stem Cells [Internet]. 2014 Feb [cited 2022 Apr 20];32(2):327–37. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24123709/
35. Mariman ECM, Wang P. Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity. Cell Mol Life Sci [Internet]. 2010 Apr 27 [cited 2022 Apr 20];67(8):1277–92. Available from: https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-010-0263-4
36. Rubin CT, Lanyon LE. Osteoregulatory nature of mechanical stimuli: Function as a determinant for adaptive remodeling in bone. J Orthop Res [Internet]. 1987 Jan 1 [cited 2022 Apr 17];5(2):300–10. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jor.1100050217
37. Plotkin LI, Manolagas SC, Bellido T. Transduction of cell survival signals by connexin-43 hemichannels. J Biol Chem [Internet]. 2002 Mar 8 [cited 2022 Apr 17];277(10):8648–57. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11741942/
38. Bonewald LF. Establishment and characterization of an osteocyte-like cell line, MLO-Y4. J Bone Miner Metab [Internet]. 1999 [cited 2022 Apr 17];17(1):61–5. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10084404/
39. Karsdal MA, Larsen L, Engsig MT, Lou H, Ferreras M, Lochter A, et al. Matrix metalloproteinase-dependent activation of latent transforming growth factor-beta controls the conversion of osteoblasts into osteocytes by blocking osteoblast apoptosis. J Biol Chem [Internet]. 2002 Nov 15 [cited 2022 May 29];277(46):44061–7. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12226090/
40. Matsuo K, Irie N. Osteoclast-osteoblast communication. Arch Biochem Biophys [Internet]. 2008 May 15 [cited 2022 May 29];473(2):201–9. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18406338/
41. Kollet O, Dar A, Shivtiel S, Kalinkovich A, Lapid K, Sztainberg Y, et al. Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. Nat Med [Internet]. 2006 Jun [cited 2022 May 29];12(6):657–64. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16715089/
42. Roodman GD. Cell biology of the osteoclast. Exp Hematol [Internet]. 1999 Aug [cited 2022 Apr 17];27(8):1229–41. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10428500/

43. Alonso-Pérez A, Franco-Trepat E, Guillán-Fresco M, Jorge-Mora A, López V, Pino J, et al. Role of toll-like receptor 4 on osteoblast metabolism and function. Front Physiol. 2018;9(MAY).
44. Charles JF, Aliprantis AO. Osteoclasts: more than 'bone eaters.' Trends Mol Med [Internet]. 2014 Aug 1 [cited 2022 May 30];20(8):449–59. Available from: http://www.cell.com/article/S1471491414000884/fulltext
45. Indo Y, Takeshita S, Ishii KA, Hoshii T, Aburatani H, Hirao A, et al. Metabolic regulation of osteoclast differentiation and function. J Bone Miner Res [Internet]. 2013 Nov 1 [cited 2022 May 30];28(11):2392–9. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jbmr.1976
46. Fernández-Tresguerres Hernández-Gil I, Angel Alobera Gracia M, del Canto Pingarrón M, Blanco Jerez L, Juan Carlos R, Titular DDS P. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process.
47. Fraher LJ. Biochemical markers of bone turnover. Clin Biochem [Internet]. 1993 [cited 2022 Apr 17];26(6):431–2. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8124854/
48. Andersen TL, Sondergaard TE, Skorzynska KE, Dagnaes-Hansen F, Plesner TL, Hauge EM, et al. A Physical Mechanism for Coupling Bone Resorption and Formation in Adult Human Bone. Am J Pathol [Internet]. 2009 [cited 2022 May 29];174(1):239. Available from: /pmc/articles/PMC2631336/
49. Kristensen HB, Andersen TL, Marcussen N, Rolighed L, Delaisse JM. Osteoblast recruitment routes in human cancellous bone remodeling. Am J Pathol [Internet]. 2014 Mar [cited 2022 May 29];184(3):778–89. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24412092/
50. Everts V, Delaissié JM, Korper W, Jansen DC, Tigchelaar-Gutter W, Saftig P, et al. The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. J Bone Miner Res [Internet]. 2002 [cited 2022 May 29];17(1):77–90. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11771672/
51. Sims NA, Martin TJ. Coupling Signals between the Osteoclast and Osteoblast: How are Messages Transmitted between These Temporary Visitors to the Bone Surface? Front Endocrinol (Lausanne) [Internet]. 2015 [cited 2022 May 29];6(MAR). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25852649/
52. Blair HC, Teitelbaum SL, Ghiselli R, Gluck S. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. Science [Internet]. 1989 [cited 2022 Apr 17];245(4920):855–7. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2528207/
53. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. Nature [Internet]. 2003 May 15 [cited 2022 Apr 17];423(6937):337–42. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12748652/
54. Silver IA, Murrills RJ, Etherington DJ. Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. Exp Cell Res [Internet]. 1988 [cited 2022 Apr 17];175(2):266–76. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3360056/
55. Delaissé JM, Andersen TL, Engsig MT, Henriksen K, Troen T, Blavier L. Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. Microsc Res Tech [Internet]. 2003 Aug 15 [cited 2022 Apr 17];61(6):504–13. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12879418/
56. Szulc P, Bauer DC, Eastell R. Biochemical Markers of Bone Turnover in Osteoporosis. Prim Metab Bone Dis Disord Miner Metab Eighth Ed [Internet]. 2013 Jul 19 [cited 2022 Apr 1];297–306. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/9781118453926.ch35
57. Eriksen EF. Normal and pathological remodeling of human trabecular bone: three

dimensional reconstruction of the remodeling sequence in normals and in metabolic bone disease. Endocr Rev [Internet]. 1986 [cited 2022 Apr 17];7(4):379–408. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3536460/
58. Reddy S V. Regulatory mechanisms operative in osteoclasts. Crit Rev Eukaryot Gene Expr [Internet]. 2004 [cited 2022 Apr 17];14(4):255–70. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15663356/
59. Bonewald LF, Mundy GR. Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling. Clin Orthop Relat Res [Internet]. 1990 [cited 2022 Apr 17];250(250):261–76. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2403492/
60. Locklin RM, Oreffo ROC, Triffitt JT. Effects of TGFbeta and bFGF on the differentiation of human bone marrow stromal fibroblasts. Cell Biol Int [Internet]. 1999 [cited 2022 Apr 17];23(3):185–94. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10562439/
61. Hock JM, Centrella M, Canalis E. Insulin-like growth factor I has independent effects on bone matrix formation and cell replication. Endocrinology [Internet]. 1988 [cited 2022 Apr 17];122(1):254–60. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3335207/
62. Young MF. Bone matrix proteins: more than markers. Calcif Tissue Int [Internet]. 2003 Jan 1 [cited 2022 Apr 17];72(1):2–4. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12710463/
63. Cohick WS, Clemmons DR. The insulin-like growth factors. Annu Rev Physiol [Internet]. 1993 [cited 2022 Apr 17];55:131–53. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8466170/
64. Bonewald LF, Dallas SL. Role of active and latent transforming growth factor beta in bone formation. J Cell Biochem [Internet]. 1994 [cited 2022 Apr 17];55(3):350–7. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7962167/
65. Canalis E, Economides AN, Gazzerro E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. Endocr Rev [Internet]. 2003 Apr 1 [cited 2022 Apr 17];24(2):218–35. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12700180/
66. Nash TJ, Howlett CR, Martin C, Steele J, Johnson KA, Hicklin DJ. Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits. Bone [Internet]. 1994 [cited 2022 Apr 17];15(2):203–8. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8086239/
67. Marie PJ. Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation. Gene [Internet]. 2003 Oct 16 [cited 2022 Apr 17];316(1–2):23–32. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14563548/
68. Kim JH, Jin HM, Kim K, Song I, Youn BU, Matsuo K, et al. The Mechanism of Osteoclast Differentiation Induced by IL-1. J Immunol [Internet]. 2009 Aug 1 [cited 2022 Apr 17];183(3):1862–70. Available from: https://www.jimmunol.org/content/183/3/1862
69. Gregory LS, Kelly WL, Reid RC, Fairlie DP, Forwood MR. Inhibitors of cyclo-oxygenase-2 and secretory phospholipase A2 preserve bone architecture following ovariectomy in adult rats. Bone [Internet]. 2006 Jul [cited 2022 Apr 18];39(1):134–42. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16473054/
70. Vasikaran S, Cooper C, Eastell R, Griesmacher A, Morris HA, Trenti T, et al. International Osteoporosis Foundation and International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Position on bone marker standards in osteoporosis. Clin Chem Lab Med [Internet]. 2011 Aug 1 [cited 2022 Apr 1];49(8):1271–4. Available from: https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/CCLM.2011.602/html
71. Wilkinson JM, Stockley I, Hamer AJ, Barrington NA, Eastell R. Biochemical markers

of bone turnover and development of heterotopic ossification after total hip arthroplasty. J Orthop Res [Internet]. 2003 [cited 2022 Apr 1];21(3):529–34. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12706027/

72. Mosialou I, Shikhel S, Liu J-MM, Maurizi A, Luo N, He Z, et al. MC4R-dependent suppression of appetite by bone-derived lipocalin 2. Nature [Internet]. 2017 Mar 16 [cited 2020 Jan 16];543(7645):385–90. Available from: www.nature.com/reprints.
73. Marques F, Rodrigues A-J, Sousa JC, Coppola G, Geschwind DH, Sousa N, et al. Lipocalin 2 is a Choroid Plexus Acute-Phase Protein. J Cereb Blood Flow Metab [Internet]. 2008 Mar 26 [cited 2020 May 7];28(3):450–5. Available from: http://journals.sagepub.com/doi/10.1038/sj.jcbfm.9600557
74. Mera P, Ferron M, Mosialou I. Regulation of energy metabolism by bone-derived hormones. Cold Spring Harb Perspect Med. 2018;8(6):1–16.
75. Villalvilla A, García-Martín A, Largo R, Gualillo O, Herrero-Beaumont G, Gómez R. The adipokine lipocalin-2 in the context of the osteoarthritic osteochondral junction. Sci Rep [Internet]. 2016 Jul 7 [cited 2016 Oct 14];6:29243. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27385438
76. Chang SY, Kim D Bin, Ko SH, Jo YH, Kim MJ. Induction mechanism of lipocalin-2 expression by co-stimulation with interleukin-1β and interferon-γ in RINm5F beta-cells. Biochem Biophys Res Commun. 2013 May 10;434(3):577–83.
77. Yan Q-WW, Yang Q, Mody N, Graham TE, Hsu C-HH, Xu Z, et al. The Adipokine Lipocalin 2 Is Regulated by Obesity and Promotes Insulin Resistance. Diabetes [Internet]. 2007 Oct [cited 2020 Jan 15];56(10):2533–40. Available from: http://diabetes.diabetesjournals.orgon
78. Chang S-YY, Kim D-B Bin, Ko S-HH, Jang H-JJ, Jo Y-HH, Kim M-JJ. The level of nitric oxide regulates lipocalin-2 expression under inflammatory condition in RINm5F beta-cells. Biochem Biophys Res Commun [Internet]. 2016 Jul 15 [cited 2017 Apr 18];476(1):7–14. Available from: https://doc-08-8o-apps-viewer.googleusercontent.com/viewer/secure/pdf/h9mqkhue4t123hnnue8k6d257ii0ifli/2k07go60staqhf2np20ukgkrc2ns3i3f/1492502625000/gmail/05062720592898865036/ACFrOgDhsGym1IS060oW5m1OopB4AWQyGtkOBlDYscn9asJFVOX_ScRJg2aOSnKnrj5UhPvDlyzupE
79. Gómez R, Scotece M, Conde J, Lopez V, Pino J, Lago F, et al. Nitric oxide boosts TLR-4 mediated lipocalin 2 expression in chondrocytes. J Orthop Res [Internet]. 2013 Jul [cited 2018 Jun 15];31(7):1046–52. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/jor.22331
80. Conde J, Lazzaro V, Scotece M, Abella V, Villar R, López V, et al. Corticoids synergize with IL-1 in the induction of LCN2. Osteoarthr Cartil. 2017 Jul 1;25(7):1172–8.
81. Sommer G, Weise S, Kralisch S, Lossner U, Bluher M, Stumvoll M, et al. Lipocalin-2 is induced by interleukin-1 β in murine adipocytes in vitro. J Cell Biochem. 2009 Jan 1;106(1):103–8.
82. Flo TH, Smith KD, Sato S, Rodriguez DJ, Holmes MA, Strong RK, et al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestrating iron. Nature. 2004 Dec 16;432(7019):917–21.
83. Xu MJ, Feng D, Wu H, Wang H, Chan Y, Kolls J, et al. Liver is the major source of elevated serum lipocalin-2 levels after bacterial infection or partial hepatectomy: A critical role for IL-6/STAT3. Hepatology. 2015 Feb 1;61(2):692–702.
84. Orabona C, Dumoutier L, Renauld JC. Interleukin-9 induces 24P3 lipocalin gene expression in murine T cell lymphomas. Eur Cytokine Netw [Internet]. 2001 Mar [cited 2020 Jan 16];12(1):154–61. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11282560
85. Shen F, Ruddy MJ, Plamondon P, Gaffen SL. Cytokines link osteoblasts and

inflammation: microarray analysis of interleukin-17- and TNF-α-induced genes in bone cells. J Leukoc Biol [Internet]. 2005 Mar 1 [cited 2020 Jan 16];77(3):388–99. Available from: http://doi.wiley.com/10.1189/jlb.0904490
86. Du Souich P. Absorption, distribution and mechanism of action of SYSADOAS. Pharmacol Ther. 2014;142:362–74.
87. Owen HC, Roberts SJ, Ahmed SF, Farquharson C. Dexamethasone-induced expression of the glucocorticoid response gene lipocalin 2 in chondrocytes. Am J Physiol - Endocrinol Metab [Internet]. 2008 Jun [cited 2020 Jan 16];294(6):1023–34. Available from: http://www.affymetrix.com/
88. Conde J, Gomez R, Bianco G, Scotece M, Lear P, Dieguez C, et al. Expanding the adipokine network in cartilage: Identification and regulation of novel factors in human and murine chondrocytes. Ann Rheum Dis [Internet]. 2011 Mar [cited 2016 Oct 14];70(3):551–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21216818
89. Guo H, Foncea R, O'Byrne SM, Jiang H, Zhang Y, Deis JA, et al. Lipocalin 2, a regulator of retinoid homeostasis and retinoid-mediated thermogenic activation in adipose tissue. J Biol Chem. 2016 May 20;291(21):11216–29.
90. Tan BK, Adya R, Shan X, Syed F, Lewandowski KC, O'hare JP, et al. Ex vivo and in vivo regulation of lipocalin-2, a novel adipokine, by Insulin. Diabetes Care. 2009 Jan 1;32(1):129–31.
91. Parker LP, Taylor DD, Kesterson S, Gercel-Taylor C. Gene expression profiling in response to estradiol and genistein in ovarian cancer cells. Cancer Genomics Proteomics [Internet]. [cited 2020 Jan 16];6(3):189–94. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19487548
92. Jung M, Ören B, Mora J, Mertens C, Dziumbla S, Popp R, et al. Lipocalin 2 from macrophages stimulated by tumor cell-derived sphingosine-1-phosphate promotes lymphangiogenesis and tumor metastasis. Sci Signal [Internet]. 2016 Jun 28 [cited 2020 Jan 16];9(434):ra64. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27353364
93. Lin H, Monaco G, Sun T, Ling X, Stephens C, Xie S, et al. Bcr-Abl-mediated suppression of normal hematopoiesis in leukemia. Oncogene. 2005 May 5;24(20):3246–56.
94. Li SH, Hawthorne VS, Neal CL, Sanghera S, Xu J, Yang J, et al. Upregulation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin by ErbB2 through nuclear factor-κB activation. Cancer Res. 2009 Dec 15;69(24):9163–8.
95. Candido S, Abrams SL, Steelman LS, Lertpiriyapong K, Fitzgerald TL, Martelli AM, et al. Roles of NGAL and MMP-9 in the tumor microenvironment and sensitivity to targeted therapy. Vol. 1863, Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research. Elsevier; 2016. p. 438–48.
96. Nakamura I, Hama S, Itakura S, Takasaki I, Nishi T, Tabuchi Y, et al. Lipocalin2 as a plasma marker for tumors with hypoxic regions. Sci Rep. 2014 Dec 3;4.
97. Jiang W, Constante M, Santos MM. Anemia upregulates lipocalin 2 in the liver and serum. Blood Cells, Mol Dis. 2008 Sep;41(2):169–74.
98. Roudkenar HM, Kuwahara Y, Baba T, Rousandeh AM, Ebishima S, Abe S, et al. Oxidative Stress Induced Lipocalin 2 Gene Expression: Addressing its Expression under the Harmful Conditions. J Radiat Res. 2007;48(1):39–44.
99. Roudkenar MH, Halabian R, Roushandeh AM, Nourani MR, Masroori N, Ebrahimi M, et al. Lipocalin 2 regulation by thermal stresses: Protective role of Lcn2/NGAL against cold and heat stresses. Exp Cell Res. 2009 Nov 1;315(18):3140–51.
100. Mahadevan NR, Rodvold J, Almanza G, Pérez AF, Wheeler MC, Zanetti M. ER stress drives Lipocalin 2 upregulation in prostate cancer cells in an NF-κB-dependent manner. BMC Cancer. 2011 Jun 7;11.

101. Rucci N, Capulli M, Piperni SG, Cappariello A, Lau P, Frings-Meuthen P, et al. Lipocalin 2: A new mechanoresponding gene regulating bone homeostasis. J Bone Miner Res [Internet]. 2015 Feb 1 [cited 2020 Jan 16];30(2):357–68. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/jbmr.2341
102. Sultan S, Ahmad S, Rave-Fränk M, Malik IA, Hess CF, Christiansen H, et al. Induction of lipocalin2 in a rat model of lung irradiation. Int J Mol Sci. 2016 May 1;17(5).
103. Park S, Guo J, Kim D, Cheng JQ. Identification of 24p3 as a direct target of Foxo3a regulated by interleukin-3 through the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. J Biol Chem. 2009 Jan 23;284(4):2187–93.
104. Drew BG, Hamidi H, Zhou Z, Villanueva CJ, Krum SA, Calkin AC, et al. Estrogen receptor (er)α-regulated lipocalin 2 expression in adipose tissue links obesity with breast cancer progression. J Biol Chem. 2015 Feb 27;290(9):5566–81.
105. Ulivi V, Cancedda R, Cancedda FD. 15-Deoxy-delta12, 14-prostaglandin J2 inhibits the synthesis of the acute phase protein SIP24 in cartilage: Involvement of COX-2 in resolution of inflammation. J Cell Physiol. 2008 Nov;217(2):433–41.
106. Han Y, You X, Xing W, Zhang Z, Zou W. Paracrine and endocrine actions of bone - The functions of secretory proteins from osteoblasts, osteocytes, and osteoclasts. Vol. 6, Bone Research. Sichuan University; 2018.
107. Hauschka P V., Lian JB, Cole DE, Gundberg CM. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependentproteins in bone. https://doi.org/101152/physrev1989693990 [Internet]. 1989 [cited 2022 Apr 4];69(3):990–1047. Available from: https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/physrev.1989.69.3.990
108. Mizokami A, Kawakubo-Yasukochi T, Hirata M. Osteocalcin and its endocrine functions. Biochem Pharmacol [Internet]. 2017 May 15 [cited 2022 Apr 4];132:1–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2017.02.001
109. Fulzele K, Riddle RC, DiGirolamo DJ, Cao X, Wan C, Chen D, et al. Insulin receptor signaling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition. Cell [Internet]. 2010 [cited 2022 Apr 4];142(2):309–19. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20655471/
110. Feng JQ, Ward LM, Liu S, Lu Y, Xie Y, Yuan B, et al. Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. Nat Genet 2006 3811 [Internet]. 2006 Oct 8 [cited 2022 Apr 4];38(11):1310–5. Available from: https://www.nature.com/articles/ng1905
111. Liu S, Zhou J, Tang W, Jiang X, Rowe DW, Quarles LD. Pathogenic role of Fgf23 in Hyp mice. Am J Physiol - Endocrinol Metab [Internet]. 2006 [cited 2022 Apr 4];291(1). Available from: https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpendo.00008.2006
112. Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Y, et al. FGF-23 Is a Potent Regulator of Vitamin D Metabolism and Phosphate Homeostasis. J Bone Miner Res [Internet]. 2004 Mar 1 [cited 2022 Apr 4];19(3):429–35. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1359/JBMR.0301264
113. Burnett SAM, Gunawardene SC, Bringhurst FR, Jüppner H, Lee H, Finkelstein JS. Regulation of C-terminal and intact FGF-23 by dietary phosphate in men and women. J Bone Miner Res [Internet]. 2006 Aug [cited 2022 Apr 4];21(8):1187–96. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16869716/
114. Takashi Y, Kosako H, Sawatsubashi S, Kinoshita Y, Ito N, Tsoumpra MK, et al. Activation of unliganded FGF receptor by extracellular phosphate potentiates proteolytic protection of FGF23 by its O-glycosylation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019;166(23):11418–27.
115. Saito H, Maeda A, Ohtomo SI, Hirata M, Kusano K, Kato S, et al. Circulating FGF-

23 Is Regulated by 1α,25-Dihydroxyvitamin D3 and Phosphorus in Vivo. J Biol Chem. 2005 Jan 28;280(4):2543–9.
116. Liu S, Tang W, Zhou J, Stubbs JR, Luo Q, Pi M, et al. Fibroblast Growth Factor 23 Is a Counter-Regulatory Phosphaturic Hormone for Vitamin D. J Am Soc Nephrol [Internet]. 2006 May 1 [cited 2022 Apr 4];17(5):1305–15. Available from: https://jasn.asnjournals.org/content/17/5/1305
117. Ito N, Wijenayaka AR, Prideaux M, Kogawa M, Ormsby RT, Evdokiou A, et al. Regulation of FGF23 expression in IDG-SW3 osteocytes and human bone by pro-inflammatory stimuli. Mol Cell Endocrinol. 2015 Jan 5;399:208–18.
118. Farrow EG, Yu X, Summers LJ, Davis SI, Fleet JC, Allen MR, et al. Iron deficiency drives an autosomal dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) phenotype in fibroblast growth factor-23 (Fgf23) knock-in mice. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2011 Nov 15 [cited 2022 Apr 4];108(46). Available from: www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1110905108/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1110905108
119. Kinoshita Y, Fukumoto S. X-Linked Hypophosphatemia and FGF23-Related Hypophosphatemic Diseases: Prospect for New Treatment. Endocr Rev [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2022 Apr 4];39(3):274–91. Available from: https://academic.oup.com/edrv/article/39/3/274/4825438
120. Shimada T, Mizutani S, Muto T, Yoneya T, Hino R, Takeda S, et al. Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2001 May 22 [cited 2022 Apr 4];98(11):6500–5. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11344269/
121. Dobnig H, Turner RT. The effects of programmed administration of human parathyroid hormone fragment (1-34) on bone histomorphometry and serum chemistry in rats. Endocrinology [Internet]. 1997 [cited 2022 Apr 4];138(11):4607–12. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9348185/
122. Claes L, Recknagel S, Ignatius A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. Nat Rev Rheumatol [Internet]. 2012 Mar [cited 2022 Mar 15];8(3):133–43. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22293759/
123. PM M, PP S, FK K, AG M, Mountziaris PM, Spicer PP, et al. Harnessing and Modulating Inflammation in Strategies for Bone Regeneration. Tissue Eng Part B Rev [Internet]. 2011 Dec 1 [cited 2022 Apr 5];17(6):393. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21615330/
124. Hardy R, Cooper MS. Bone loss in inflammatory disorders. J Endocrinol [Internet]. 2009 [cited 2022 Apr 17];201(3):309–20. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19443863/
125. Haas S, Krins S, Knauerhase A, Löhr M. Altered bone metabolism and bone density in patients with chronic pancreatitis and pancreatic exocrine insufficiency. JOP [Internet]. 2015 [cited 2022 Apr 17];16(1):58–62. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25640785/
126. Cao JJ. Effects of obesity on bone metabolism. J Orthop Surg Res [Internet]. 2011 Jun 15 [cited 2022 Apr 17];6(1). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21676245/
127. Alblowi J, Kayal RA, Siqueria M, McKenzie E, Krothapalli N, McLean J, et al. High levels of tumor necrosis factor-alpha contribute to accelerated loss of cartilage in diabetic fracture healing. Am J Pathol [Internet]. 2009 [cited 2022 Apr 17];175(4):1574–85. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19745063/
128. Vargas SJ, Naprta A, Glaccum M, Lee SK, Kalinowski J, Lorenzo JA. Interleukin-6 expression and histomorphometry of bones from mice deficient in receptors for interleukin-1 or tumor necrosis factor. J Bone Miner Res [Internet]. 1996 [cited 2022

Apr 17];11(11):1736–44. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8915781/
129. Abraham BP, Mehta S, El-Serag HB. Natural history of pediatric-onset inflammatory bowel disease: A systematic review. J Clin Gastroenterol [Internet]. 2012 Aug [cited 2022 Apr 17];46(7):581–9. Available from: https://journals.lww.com/jcge/Fulltext/2012/08000/Natural_History_of_Pediatric_onset_Inflammatory.11.aspx
130. Ballinger AB, Azooz O, El-Haj T, Poole S, Farthing MJG. Growth failure occurs through a decrease in insulin-like growth factor 1 which is independent of undernutrition in a rat model of colitis. Gut [Internet]. 2000 May 1 [cited 2022 Apr 17];46(5):695–700. Available from: https://gut.bmj.com/content/46/5/695
131. MacRae VE, Wong SC, Farquharson C, Ahmed SF. Cytokine actions in growth disorders associated with pediatric chronic inflammatory diseases (Review). Int J Mol Med [Internet]. 2006 Dec 1 [cited 2022 Apr 17];18(6):1011–8. Available from: http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.18.6.1011/abstract
132. Fernandez-Vojvodich P, Palmblad K, Karimian E, Andersson U, Sävendahl L. Pro-Inflammatory Cytokines Produced by Growth Plate Chondrocytes May Act Locally to Modulate Longitudinal Bone Growth. Horm Res Paediatr [Internet]. 2012 May [cited 2022 Apr 17];77(3):180–7. Available from: https://www.karger.com/Article/FullText/337569
133. Clark D, Nakamura M, Miclau T, Marcucio R. Effects of Aging on Fracture Healing. Curr Osteoporos Reports 2017 156 [Internet]. 2017 Nov 16 [cited 2022 Apr 17];15(6):601–8. Available from: https://link.springer.com/article/10.1007/s11914-017-0413-9
134. Brem H, Tomic-Canic M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. J Clin Invest [Internet]. 2007 May 1 [cited 2022 Apr 17];117(5):1219–22. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17476353/
135. Timmen M, Hidding H, Wieskötter B, Baum W, Pap T, Raschke MJ, et al. Influence of antiTNF-alpha antibody treatment on fracture healing under chronic inflammation. BMC Musculoskelet Disord [Internet]. 2014 May 29 [cited 2022 Apr 17];15(1):184. Available from: /pmc/articles/PMC4059090/
136. Gao F, Lv TR, Zhou JC, Qin XD. Effects of obesity on the healing of bone fracture in mice. J Orthop Surg Res [Internet]. 2018 Jun 8 [cited 2022 Apr 17];13(1). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29880016/
137. Robinson MM, Court-Brown CM, McQueen MM, Wakefield AE. Estimating the risk of nonunion following nonoperative treatment of a clavicular fracture. J Bone Jt Surg - Ser A. 2004;86(7):1359–65.
138. Court-Brown CM, McQueen MM. Nonunions of the proximal humerus: their prevalence and functional outcome. J Trauma [Internet]. 2008 Jun [cited 2022 Apr 17];64(6):1517–21. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18545116/
139. Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. Ann N Y Acad Sci [Internet]. 2000 [cited 2022 Apr 17];908:244–54. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10911963/
140. Karladani AH, Granhed H, Kärrholm J, Styf J. The influence of fracture etiology and type on fracture healing: a review of 104 consecutive tibial shaft fractures. Arch Orthop Trauma Surg [Internet]. 2001 [cited 2022 Apr 17];121(6):325–8. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11482464/
141. Li Y, Ling J, Jiang Q. Inflammasomes in Alveolar Bone Loss. Front Immunol [Internet]. 2021 Jun 9 [cited 2022 Apr 17];12. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34177950/

142. Roper PM, Shao C, Veis DJ. Multitasking by the OC Lineage during Bone Infection: Bone Resorption, Immune Modulation, and Microbial Niche. Cells 2020, Vol 9, Page 2157 [Internet]. 2020 Sep 24 [cited 2022 Apr 17];9(10):2157. Available from: https://www.mdpi.com/2073-4409/9/10/2157/htm
143. Yin W, Liu S, Dong M, Liu Q, Shi C, Bai H, et al. A New NLRP3 Inflammasome Inhibitor, Dioscin, Promotes Osteogenesis. Small [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2022 Apr 17];16(1):1905977. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/smll.201905977
144. Xu L, Zhang L, Wang Z, Li C, Li S, Li L, et al. Melatonin Suppresses Estrogen Deficiency-Induced Osteoporosis and Promotes Osteoblastogenesis by Inactivating the NLRP3 Inflammasome. Calcif Tissue Int 2018 1034 [Internet]. 2018 May 26 [cited 2022 Apr 17];103(4):400–10. Available from: https://link.springer.com/article/10.1007/s00223-018-0428-y
145. Rudnicki MA, Williams BO. Wnt signaling in bone and muscle. 2015;
146. Guo R, Yamashita M, Zhang Q, Zhou Q, Chen D, Reynolds DG, et al. Ubiquitin Ligase Smurf1 Mediates Tumor Necrosis Factor-induced Systemic Bone Loss by Promoting Proteasomal Degradation of Bone Morphogenetic Signaling Proteins. J Biol Chem [Internet]. 2008 Aug 22 [cited 2022 Apr 17];283(34):23084. Available from: /pmc/articles/PMC2517001/
147. Clowes JA, Riggs BL, Khosla S. The role of the immune system in the pathophysiology of osteoporosis. Immunol Rev [Internet]. 2005 Dec [cited 2022 Apr 17];208:207–27. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16313351/
148. Wei S, Kitaura H, Zhou P, Ross FP, Teitelbaum SL. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. J Clin Invest [Internet]. 2005 Feb 1 [cited 2022 Apr 17];115(2):282–90. Available from: http://www.jci.org
149. Cho HB, Kim JH. Lipocalin2 expressions correlate significantly with tumor differentiation in epithelial ovarian cancer. J Histochem Cytochem. 2009 May;57(5):513–21.
150. Horwood NJ, Udagawa N, Elliott J, Grail D, Okamura H, Kurimoto M, et al. Interleukin 18 inhibits osteoclast formation via T cell production of granulocyte macrophage colony-stimulating factor. J Clin Invest [Internet]. 1998 Feb 1 [cited 2022 Apr 17];101(3):595–603. Available from: http://www.jci.org
151. Zhang W, Cong XL, Qin YH, He ZW, He DY, Dai SM. IL-18 Upregulates the Production of Key Regulators of Osteoclastogenesis from Fibroblast-Like Synoviocytes in Rheumatoid Arthritis. Inflamm 2012 361 [Internet]. 2012 Sep 4 [cited 2022 Apr 17];36(1):103–9. Available from: https://link.springer.com/article/10.1007/s10753-012-9524-8
152. Findlay DM, Atkins GJ. Osteoblast-chondrocyte interactions in osteoarthritis. Curr Osteoporos Rep [Internet]. 2014 [cited 2022 Apr 17];12(1):127–34. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24458429/
153. Lee J, Chang RW, Ehrlich-Jones L, Kwoh CK, Nevitt M, Semanik PA, et al. Sedentary Behavior and Physical Function: Objective Evidence From the Osteoarthritis Initiative. Arthritis Care Res (Hoboken) [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2021 Oct 7];67(3):366–73. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/acr.22432
154. Chiba K, Uetani M, Kido Y, Ito M, Okazaki N, Taguchi K, et al. Osteoporotic changes of subchondral trabecular bone in osteoarthritis of the knee: a 3-T MRI study. Osteoporos Int [Internet]. 2012 Feb 26 [cited 2016 Dec 16];23(2):589–97. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21359670
155. Gómez R, Villalvilla A, Largo R, Gualillo O, Herrero-Beaumont G. TLR4 signalling in osteoarthritis-finding targets for candidate DMOADs. Nat Rev Rheumatol

[Internet]. 2014 Mar 5 [cited 2022 May 19];11(3):1–12. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25512010
156. Sharma AR, Jagga S, Lee S-S, Nam J-S. Interplay between Cartilage and Subchondral Bone Contributing to Pathogenesis of Osteoarthritis. Int J Mol Sci Int J Mol Sci [Internet]. 2013 [cited 2016 Sep 20];14. Available from: www.mdpi.com/journal/ijms
157. Sanchez C, Pesesse L, Gabay O, Delcour J-PP, Msika P, Baudouin C, et al. Regulation of subchondral bone osteoblast metabolism by cyclic compression. 2012 Apr [cited 2016 Dec 16];64(4):1193–203. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22034083/
158. Zhen G, Cao X. Targeting TGFβ signaling in subchondral bone and articular cartilage homeostasis. Trends Pharmacol Sci [Internet]. 2014 [cited 2022 Apr 17];35(5):227–36. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24745631/
159. Sanchez C, Deberg MA, Piccardi N, Msika P, Reginster JYL, Henrotin YE. Osteoblasts from the sclerotic subchondral bone downregulate aggrecan but upregulate metalloproteinases expression by chondrocytes. This effect is mimicked by interleukin-6, -1β and oncostatin M pre-treated non-sclerotic osteoblasts. Osteoarthr Cartil [Internet]. 2005 Nov [cited 2022 Apr 17];11(13):979–87. Available from: https://www.infona.pl//resource/bwmeta1.element.elsevier-5c688e07-bccc-36cd-b1ae-e07e0bed1fd9
160. Van der Kraan PM, Van den Berg WB. Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage degeneration? Osteoarthr Cartil [Internet]. 2012 Mar [cited 2022 Apr 17];20(3):223–32. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22178514/
161. Lories RJ, Luyten FP. The bone-cartilage unit in osteoarthritis. Nat Rev Rheumatol [Internet]. 2011 Jan [cited 2022 Apr 17];7(1):43–9. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21135881/
162. Wu DD, Burr DB, Boyd RD, Radin EL. Bone and cartilage changes following experimental varus or valgus tibial angulation. J Orthop Res [Internet]. 1990 [cited 2022 Apr 17];8(4):572–85. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2355297/
163. Villalvilla A, Gómez R, Largo R, Herrero-Beaumont G. Lipid Transport and Metabolism in Healthy and Osteoarthritic Cartilage. Int J Mol Sci [Internet]. 2013 Oct 16 [cited 2022 Apr 17];14(10):20793. Available from: /pmc/articles/PMC3821643/
164. Herrero-Beaumont G, Roman-Blas JA. Osteoarthritis: Osteoporotic OA: a reasonable target for bone-acting agents. Nat Rev Rheumatol [Internet]. 2013 Jul 16 [cited 2017 Jan 24];9(8):448–50. Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrrheum.2013.113
165. Shields M, Tremblay MS. Sedentary behaviour and obesity. 2008 [cited 2022 Apr 17]; Available from: www.statcan.ca
166. Creamer P, Hochberg MC. Osteoarthritis. Lancet (London, England) [Internet]. 1997 Aug 16 [cited 2022 Apr 17];350(9076):503–9. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9274595/
167. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. Injury. 2011 Jun 1;42(6):551–5.
168. Yuasa M, Mignemi NA, Nyman JS, Duvall CL, Schwartz HS, Okawa A, et al. Fibrinolysis is essential for fracture repair and prevention of heterotopic ossification. J Clin Invest [Internet]. 2015 Aug 3 [cited 2022 Apr 18];125(8):3117–31. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26214526/
169. Edderkaoui B. Potential role of chemokines in fracture repair. Front Endocrinol (Lausanne). 2017 Mar 2;8(MAR):39.
170. Huang R, Wang X, Zhou Y, Xiao Y. RANKL-induced M1 macrophages are involved

in bone formation. Bone Res 2017 51 [Internet]. 2017 Oct 17 [cited 2022 Apr 18];5(1):1–13. Available from: https://www.nature.com/articles/boneres201719
171. Kon T, Cho TJ, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D, et al. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. J Bone Miner Res [Internet]. 2001 [cited 2022 Apr 18];16(6):1004–14. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11393777/
172. Rundle CH, Wang H, Yu H, Chadwick RB, Davis EI, Wergedal JE, et al. Microarray analysis of gene expression during the inflammation and endochondral bone formation stages of rat femur fracture repair. Bone [Internet]. 2006 Apr [cited 2022 Apr 18];38(4):521–9. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16321582/
173. Schlundt C, Reinke S, Geissler S, Bucher CH, Giannini C, Märdian S, et al. Individual effector/regulator T cell ratios impact bone regeneration. Front Immunol. 2019;10(AUG):1954.
174. Jin JO, Han X, Yu Q. Interleukin-6 induces the generation of IL-10-producing Tr1 cells and suppresses autoimmune tissue inflammation. J Autoimmun. 2013 Feb 1;40(1):28–44.
175. Roszer T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. Mediators Inflamm [Internet]. 2015 [cited 2022 Apr 18];2015. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26089604/
176. Xiao LZ, Topley N, Ito T, Phillips A. Interleukin-6 Regulation of Transforming Growth Factor (TGF)-β Receptor Compartmentalization and Turnover Enhances TGF-β1 Signaling. J Biol Chem. 2005 Apr 1;280(13):12239–45.
177. Komai T, Inoue M, Okamura T, Morita K, Iwasaki Y, Sumitomo S, et al. Transforming growth factor-β and interleukin-10 synergistically regulate humoral immunity via modulating metabolic signals. Front Immunol. 2018 Jun 14;9(JUN):1364.
178. Oh SA, Li MO. TGF-β: Guardian of T Cell Function. J Immunol [Internet]. 2013 Oct 15 [cited 2022 Apr 18];191(8):3973–9. Available from: https://www.jimmunol.org/content/191/8/3973
179. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. Nature [Internet]. 1992 [cited 2022 Apr 18];359(6397):693–9. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1436033/
180. Reible B, Schmidmaier G, Moghaddam A, Westhauser F. Insulin-Like Growth Factor-1 as a Possible Alternative to Bone Morphogenetic Protein-7 to Induce Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells in Vitro. Int J Mol Sci 2018, Vol 19, Page 1674 [Internet]. 2018 Jun 5 [cited 2022 Apr 18];19(6):1674. Available from: https://www.mdpi.com/1422-0067/19/6/1674/htm
181. Kitaori T, Ito H, Schwarz EM, Tsutsumi R, Yoshitomi H, Oishi S, et al. Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for the recruitment of mesenchymal stem cells to the fracture site during skeletal repair in a mouse model. Arthritis Rheum [Internet]. 2009 Mar [cited 2022 Apr 18];60(3):813–23. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19248097/
182. Glass GE, Chan JK, Freidin A, Feldmann M, Horwood NJ, Nanchahal J. TNF-alpha promotes fracture repair by augmenting the recruitment and differentiation of muscle-derived stromal cells. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2011 Jan 25 [cited 2022 Apr 18];108(4):1585–90. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21209334/
183. Gerstenfeld LC, Cho TJ, Kon T, Aizawa T, Tsay A, Fitch J, et al. Impaired Fracture Healing in the Absence of TNF-α Signaling: The Role of TNF-α in Endochondral

Cartilage Resorption. J Bone Miner Res [Internet]. 2003 Sep 1 [cited 2022 Apr 18];18(9):1584–92. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1359/jbmr.2003.18.9.1584
184. Sartoretto S, Gemini-Piperni S, da Silva RA, Calasans MD, Rucci N, Pires dos Santos TM, et al. Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase-1 recruitment domain (ASC) contributes to osteoblast differentiation and osteogenesis. J Cell Physiol. 2019 Apr 1;234(4):4140–53.
185. Jiao H, Xiao E, Graves DT. Diabetes and Its Effect on Bone and Fracture Healing. Curr Osteoporos Reports 2015 135 [Internet]. 2015 Aug 9 [cited 2022 Apr 18];13(5):327–35. Available from: https://link.springer.com/article/10.1007/s11914-015-0286-8
186. Osta B, Roux JP, Lavocat F, Pierre M, Ndongo-Thiam N, Boivin G, et al. Differential Effects of IL-17A and TNF-α on Osteoblastic Differentiation of Isolated Synoviocytes and on Bone Explants from Arthritis Patients. Front Immunol [Internet]. 2015 [cited 2022 Apr 18];6(APR). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25904914/
187. Jacques P, Lambrecht S, Verheugen E, Pauwels E, Kollias G, Armaka M, et al. Proof of concept: enthesitis and new bone formation in spondyloarthritis are driven by mechanical strain and stromal cells. Ann Rheum Dis [Internet]. 2014 Feb [cited 2022 Apr 18];73(2):437–45. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23921997/
188. Baraliakos X, Haibel H, Listing J, Sieper J, Braun J. Continuous long-term anti-TNF therapy does not lead to an increase in the rate of new bone formation over 8 years in patients with ankylosing spondylitis. Ann Rheum Dis [Internet]. 2014 [cited 2022 Apr 18];73(4):710–5. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23505240/
189. Li X, Wang J, Zhan Z, Li S, Zheng Z, Wang T, et al. Inflammation Intensity–Dependent Expression of Osteoinductive Wnt Proteins Is Critical for Ectopic New Bone Formation in Ankylosing Spondylitis. 2018 Jul 1 [cited 2022 Apr 5];70(7):1056–70. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/art.40468
190. Aspenberg P. To cite this article: Per Aspenberg (2005) Drugs and fracture repair. Acta Orthop [Internet]. 2009 [cited 2022 Apr 18];76(6):741–8. Available from: https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=iort20
191. Kaplan FS, Le Merrer M, Glaser DL, Pignolo RJ, Goldsby RE, Kitterman JA, et al. Fibrodysplasia ossificans progressiva. Best Pract Res Clin Rheumatol [Internet]. 2008 Mar [cited 2022 Mar 15];22(1):191. Available from: /pmc/articles/PMC2424023/
192. Van Der Goes MC, Jacobs JWG, Boers M, Andrews T, Blom-Bakkers MAM, Buttgereit F, et al. Monitoring adverse events of low-dose glucocorticoid therapy: EULAR recommendations for clinical trials and daily practice. Ann Rheum Dis [Internet]. 2010 Nov [cited 2022 Apr 18];69(11):1913–9. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20693273/
193. Hoes JN, Jacobs JWG, Buttgereit F, Bijlsma JWJ. Current view of glucocorticoid co-therapy with DMARDs in rheumatoid arthritis. Nat Rev Rheumatol [Internet]. 2010 Dec [cited 2022 Apr 18];6(12):693–702. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21119718/
194. Lyritis G, Papadopoulou Z, Nikiforidis P, Batrinos M, Varonos D. Effect of cortisone and an anabolic steroid upon plasma hydroxyproline during fracture healing in rabbits. Acta Orthop Scand [Internet]. 1975 [cited 2022 Apr 18];46(1):25–30. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1136733/
195. Waters R V., Gamradt SC, Asnis P, Vickery BH, Avnur Z, Hill E, et al. Systemic corticosteroids inhibit bone healing in a rabbit ulnar osteotomy model. Acta Orthop Scand [Internet]. 2000 [cited 2022 Apr 18];71(3):316–21. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10919307/

196. Gilley RS, Wallace LJ, Bourgeault CA, Kidder LS, Bechtold JE. OP-1 Augments Glucocorticoid-inhibited Fracture Healing in a Rat Fracture Model. Clin Orthop Relat Res [Internet]. 2009 [cited 2022 Apr 18];467(12):3104. Available from: /pmc/articles/PMC2772924/
197. Zhang X, Schwarz EM, Young DA, Puzas JE, Rosier RN, O'Keefe RJ. Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair. J Clin Invest [Internet]. 2002 Jun 1 [cited 2022 Apr 18];109(11):1405–15. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12045254/
198. Diaz-Flores L, Gutierrez R, Valladares F, Varela H, Perez M. Intense vascular sprouting from rat femoral vein induced by prostaglandins E1 and E2. Anat Rec [Internet]. 1994 [cited 2022 Apr 18];238(1):68–76. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7509581/
199. Hausman MR, Schaffler MB, Majeska RJ. Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis. Bone [Internet]. 2001 [cited 2022 Apr 18];29(6):560–4. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11728927/
200. Murnaghan M, Li G, Marsh DR. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced fracture nonunion: an inhibition of angiogenesis? J Bone Joint Surg Am [Internet]. 2006 [cited 2022 Apr 18];88 Suppl 3(SUPPL. 3):140–7. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17079380/
201. Ueda K, Saito A, Nakano H, Aoshima M, Yokota M, Muraoka R, et al. Cortical hyperostosis following long-term administration of prostaglandin E1 in infants with cyanotic congenital heart disease. J Pediatr [Internet]. 1980 [cited 2022 Apr 18];97(5):834–6. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7000997/
202. Woodiel FN, Fall PM, Raisz LG. Anabolic effects of prostaglandins in cultured fetal rat calvariae: structure-activity relations and signal transduction pathway. J Bone Miner Res [Internet]. 1996 [cited 2022 Apr 18];11(9):1249–55. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8864899/
203. Yamaguchi DT, Green J, Merritt BS, Kleeman CR, Muallem S. Modulation of osteoblast function by prostaglandins. Am J Physiol [Internet]. 1989 [cited 2022 Apr 18];257(5 Pt 2). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2556035/
204. O'Connor JP. Animal models of heterotopic ossification. Clin Orthop Relat Res [Internet]. 1998 Jan 1 [cited 2022 Apr 18];346(346):71–80. Available from: https://europepmc.org/article/med/9577413
205. Cottrell J, O'Connor JP. Effect of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs on Bone Healing. Pharmaceuticals (Basel) [Internet]. 2010 [cited 2022 Apr 18];3(5):1668–93. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27713323/
206. Su B, O'Connor JP. Role of Inflammation in Skeletal Muscle, Connective Tissue, and Exertional Injuries: To Block or Not to Block?: NSAID therapy effects on healing of bone, tendon, and the enthesis. J Appl Physiol [Internet]. 2013 Sep 15 [cited 2022 Apr 18];115(6):892. Available from: /pmc/articles/PMC3764618/
207. Neal BC, Rodgers A, Clark T, Gray H, Reid IR, Dunn L, et al. A systematic survey of 13 randomized trials of non-steroidal anti-inflammatory drugs for the prevention of heterotopic bone formation after major hip surgery. Acta Orthop Scand [Internet]. 2000 [cited 2022 Apr 18];71(2):122–8. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10852316/
208. Burd TA, Hughes MS, Anglen JO. Heterotopic ossification prophylaxis with indomethacin increases the risk of long-bone nonunion. 2003;85:700–5.
209. Burd TA, Lowry KJ, Anglen JO. Indomethacin compared with localized irradiation for the prevention of heterotopic ossification following surgical treatment of acetabular fractures. J Bone Joint Surg Am [Internet]. 2001 [cited 2022 Apr 18];83(12).

Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11741055/
210. Clabaut A, Delplace S, Chauveau C, Hardouin P, Broux O. Human osteoblasts derived from mesenchymal stem cells express adipogenic markers upon coculture with bone marrow adipocytes. Differentiation. 2010 Jul 1;80(1):40–5.
211. Morroni M, De Matteis R, Palumbo C, Ferretti M, Villa I, Rubinacci A, et al. In vivo leptin expression in cartilage and bone cells of growing rats and adult humans. J Anat [Internet]. 2004 Oct [cited 2022 Apr 21];205(4):291. Available from: /pmc/articles/PMC1571344/
212. Gordeladze JO, Drevon CA, Syversen U, Reseland JE. Leptin stimulates human osteoblastic cell proliferation, de novo collagen synthesis, and mineralization: Impact on differentiation markers, apoptosis, and osteoclastic signaling. J Cell Biochem [Internet]. 2002 [cited 2022 Apr 20];85(4):825–36. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11968022/
213. Cornish J, Callon KE, Bava U, Lin C, Naot D, Hill BL, et al. Leptin directly regulates bone cell function in vitro and reduces bone fragility in vivo. J Endocrinol [Internet]. 2002 Nov 1 [cited 2022 Apr 20];175(2):405–15. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12429038/
214. Hamrick MW, Pennington C, Newton D, Xie D, Isales C. Leptin deficiency produces contrasting phenotypes in bones of the limb and spine. Bone [Internet]. 2004 Mar [cited 2022 Apr 21];34(3):376–83. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15003785/
215. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa JI, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. Biochem Biophys Res Commun [Internet]. 1999 Apr 2 [cited 2022 Apr 21];257(1):79–83. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10092513/
216. Naot D, Watson M, Callon KE, Tuari D, Musson DS, Choi AJ, et al. Reduced bone density and cortical bone indices in female adiponectin-knockout mice. Endocrinology. 2016 Sep 1;157(9):3550–61.
217. Fain JN. Release of Interleukins and Other Inflammatory Cytokines by Human Adipose Tissue Is Enhanced in Obesity and Primarily due to the Nonfat Cells. Vitam Horm. 2006;74(06):443–77.
218. Lin CH, Li NT, Cheng HS, Yen ML. Oxidative stress induces imbalance of adipogenic/osteoblastic lineage commitment in mesenchymal stem cells through decreasing SIRT1 functions. J Cell Mol Med. 2018;22(2):786–96.
219. Gunaratnam K, Vidal C, Gimble JM, Duque G. Mechanisms of palmitate-induced lipotoxicity in human osteoblasts. Endocrinology [Internet]. 2014 Jan [cited 2022 Apr 21];155(1):108–16. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24169557/
220. Elbaz A, Wu X, Rivas D, Gimble JM, Duque G. Inhibition of fatty acid biosynthesis prevents adipocyte lipotoxicity on human osteoblasts in vitro. J Cell Mol Med [Internet]. 2010 Apr [cited 2022 Apr 21];14(4):982–91. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19382912/
221. Li J, Liu X, Zuo B, Zhang L. The Role of Bone Marrow Microenvironment in Governing the Balance between Osteoblastogenesis and Adipogenesis. Aging Dis [Internet]. 2015 [cited 2022 Apr 21];7(4):514–25. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27493836/
222. Li CJ, Xiao Y, Yang M, Su T, Sun X, Guo Q, et al. Long noncoding RNA Bmncr regulates mesenchymal stem cell fate during skeletal aging. J Clin Invest [Internet]. 2018 Dec 3 [cited 2022 Apr 21];128(12):5219–21. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30352426/
223. Pierce JL, Begun DL, Westendorf JJ, McGee-Lawrence ME. Defining osteoblast and adipocyte lineages in the bone marrow. Bone. 2019;118:2–7.

224. McGee-Lawrence ME, Carpio LR, Schulze RJ, Pierce JL, McNiven MA, Farr JN, et al. Hdac3 Deficiency Increases Marrow Adiposity and Induces Lipid Storage and Glucocorticoid Metabolism in Osteochondroprogenitor Cells. J Bone Miner Res [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2022 Apr 21];31(1):116–28. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26211746/
225. Poulos SP, Dodson M V., Hausman GJ. Cell line models for differentiation: Preadipocytes and adipocytes. Exp Biol Med. 2010;235(10):1185–93.
226. Czekanska EM, Stoddart MJ, Richards RG, Hayes JS. In search of an osteoblast cell model for in vitro research [Internet]. Vol. 24, European Cells and Materials. AO Research Institute Davos; 2012 [cited 2021 Jan 12]. p. 1–17. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22777949/
227. Sulston RJ, Cawthorn WP. Bone marrow adipose tissue as an endocrine organ: close to the bone? Horm Mol Biol Clin Investig [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2022 Apr 21];28(1):21–38. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27149203/
228. Wan Y, Chong LW, Evans RM. PPAR-gamma regulates osteoclastogenesis in mice. Nat Med [Internet]. 2007 Dec [cited 2022 Apr 21];13(12):1496–503. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18059282/
229. Li CJ, Cheng P, Liang MK, Chen YS, Lu Q, Wang JY, et al. MicroRNA-188 regulates age-related switch between osteoblast and adipocyte differentiation. J Clin Invest [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2022 Apr 21];125(4):1509. Available from: /pmc/articles/PMC4396470/
230. Almeida M, Han L, Martin-Millan M, Plotkin LI, Stewart SA, Roberson PK, et al. Skeletal involution by age-associated oxidative stress and its acceleration by loss of sex steroids. J Biol Chem [Internet]. 2007 Sep 14 [cited 2022 Apr 21];282(37):27285–97. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17623659/
231. Peng H, Yang M, Guo Q, Su T, Xiao Y, Xia ZY. Dendrobium officinale polysaccharides regulate age-related lineage commitment between osteogenic and adipogenic differentiation. Cell Prolif. 2019;52(4):1–10.
232. Yu B, Wang CY. Osteoporosis: The Result of an "Aged" Bone Microenvironment. Trends Mol Med [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2022 Apr 21];22(8):641–4. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27354328/
233. Harvey N, Dennison E, Cooper C. Osteoporosis: impact on health and economics. Nat Rev Rheumatol [Internet]. 2010 [cited 2022 Apr 21];6(2):99–105. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20125177/
234. Demontiero O, Vidal C, Duque G. Aging and bone loss: new insights for the clinician. Ther Adv Musculoskelet Dis [Internet]. 2012 [cited 2022 Apr 21];4(2):61–76. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22870496/
235. Eriksen EF, Hodgson SF, Eastell R, RIGGS BL, Cedel SL, O'Fallon WM. Cancellous bone remodeling in type I (postmenopausal) osteoporosis: quantitative assessment of rates of formation, resorption, and bone loss at tissue and cellular levels. J Bone Miner Res [Internet]. 1990 [cited 2022 Apr 21];5(4):311–9. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2343771/
236. Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. J Clin Invest [Internet]. 2005 Dec [cited 2022 Apr 21];115(12):3318–25. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16322775/
237. Jilka RL. Cytokines, bone remodeling, and estrogen deficiency: a 1998 update. Bone [Internet]. 1998 Aug [cited 2022 Apr 21];23(2):75–81. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9701464/
238. Pacifici R. Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis--the second decade. Endocrinology [Internet]. 1998 Jun [cited 2022 Apr 21];139(6):2659–61. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9607769/

239. Pacifici R, Rifas L, Teitelbaum S, Slatopolsky E, McCracken R, Bergfeld M, et al. Spontaneous release of interleukin 1 from human blood monocytes reflects bone formation in idiopathic osteoporosis. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 1987 [cited 2022 Apr 21];84(13):4616–20. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3496597/
240. Shevde NK, Bendixen AC, Dienger KM, Pike JW. Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2000 Jul 5 [cited 2022 Apr 21];97(14):7829–34. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10869427/
241. Srivastava S, Toraldo G, Weitzmann MN, Cenci S, Ross FP, Pacifici R. Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL)-induced JNK activation. J Biol Chem [Internet]. 2001 Mar 23 [cited 2022 Apr 21];276(12):8836–40. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11121427/
242. Cao J, Venton L, Sakata T, Halloran BP. Expression of RANKL and OPG correlates with age-related bone loss in male C57BL/6 mice. J Bone Miner Res [Internet]. 2003 Feb 1 [cited 2022 Apr 21];18(2):270–7. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12568404/
243. Saika M, Inoue D, Kido S, Matsumoto T. 17beta-estradiol stimulates expression of osteoprotegerin by a mouse stromal cell line, ST-2, via estrogen receptor-alpha. Endocrinology [Internet]. 2001 [cited 2022 Apr 21];142(6):2205–12. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11356664/
244. Hughes DE, Dai A, Tiffee JC, Li HH, Munoy GR, Boyce BF. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. Nat Med [Internet]. 1996 Oct [cited 2022 Apr 21];2(10):1132–5. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8837613/
245. Almeida M, Han L, Martin-Millan M, O'Brien CA, Manolagas SC. Oxidative stress antagonizes Wnt signaling in osteoblast precursors by diverting beta-catenin from T cell factor- to forkhead box O-mediated transcription. J Biol Chem [Internet]. 2007 Sep 14 [cited 2022 Apr 21];282(37):27298–305. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17623658/
246. Manolagas SC. From estrogen-centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. Endocr Rev [Internet]. 2010 Jun [cited 2022 Apr 21];31(3):266–300. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20051526/
247. Zayzafoon M, Fulzele K, McDonald JM. Calmodulin and calmodulin-dependent kinase IIalpha regulate osteoblast differentiation by controlling c-fos expression. J Biol Chem [Internet]. 2005 Feb 25 [cited 2022 Apr 21];280(8):7049–59. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15590632/
248. Yeo H, Beck LH, McDonald JM, Zayzafoon M. Cyclosporin A elicits dose-dependent biphasic effects on osteoblast differentiation and bone formation. Bone [Internet]. 2007 Jun [cited 2022 Apr 21];40(6):1502–16. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17392048/
249. Rivadeneira F, Houwing-Duistermaat JJ, Vaessen N, Vergeer-Drop JM, Hofman A, Pols HAP, et al. Association between an insulin-like growth factor I gene promoter polymorphism and bone mineral density in the elderly: the Rotterdam Study. J Clin Endocrinol Metab [Internet]. 2003 Aug 1 [cited 2022 Apr 21];88(8):3878–84. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12915683/
250. Langlois JA, Rosen CJ, Visser M, Hannan MT, Harris T, Wilson PWF, et al. Association between insulin-like growth factor I and bone mineral density in older women and men: the Framingham Heart Study. J Clin Endocrinol Metab [Internet].

1998 Dec 1 [cited 2022 Apr 21];83(12):4257–62. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9851760/
251. Riggs BL. Role of the vitamin D-endocrine system in the pathophysiology of postmenopausal osteoporosis. J Cell Biochem [Internet]. 2003 Feb 1 [cited 2022 Apr 21];88(2):209–15. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12520516/
252. Khosla S, Melton LJ, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Klee GG, Riggs BL. Relationship of serum sex steroid levels and bone turnover markers with bone mineral density in men and women: a key role for bioavailable estrogen. J Clin Endocrinol Metab [Internet]. 1998 Jul 1 [cited 2022 Apr 21];83(7):2266–74. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9661593/
253. Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, et al. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. Endocrinology [Internet]. 1999 [cited 2022 Apr 21];140(10):4382–9. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10499489/
254. Jia D, O'Brien CA, Stewart SA, Manolagas SC, Weinstein RS. Glucocorticoids act directly on osteoclasts to increase their life span and reduce bone density. Endocrinology [Internet]. 2006 [cited 2022 Apr 21];147(12):5592–9. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16935844/
255. Zayzafoon M, Meyers VE, McDonald JM. Microgravity: the immune response and bone. Immunol Rev [Internet]. 2005 [cited 2022 Apr 21];208:267–80. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16313354/
256. Anandacoomarasamy A, Caterson I, Sambrook P, Fransen M, March L. The impact of obesity on the musculoskeletal system. [cited 2022 Mar 15];32(2):211–22. Available from: https://www.nature.com/articles/0803715
257. Canavan B, Salem RO, Schurgin S, Koutkia P, Lipinska I, Laposata M, et al. Effects of physiological leptin administration on markers of inflammation, platelet activation, and platelet aggregation during caloric deprivation. J Clin Endocrinol Metab [Internet]. 2005 Oct [cited 2022 Apr 21];90(10):5779–85. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16076944/
258. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. Nature [Internet]. 2000 Apr 6 [cited 2022 Apr 21];404(6778):635–43. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10766250/
259. Reid IR, Ames R, Evans MC, Sharpe S, Gamble G, France JT, et al. Determinants of total body and regional bone mineral density in normal postmenopausal women--a key role for fat mass. J Clin Endocrinol Metab [Internet]. 1992 [cited 2022 Apr 21];75(1):45–51. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1619030/
260. Villareal DT, Apovian CM, Kushner RF, Klein S. Obesity in older adults: technical review and position statement of the American Society for Nutrition and NAASO, The Obesity Society. Am J Clin Nutr [Internet]. 2005 [cited 2022 Apr 21];82(5):923–34. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16280421/
261. Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Anderson JJ. Effects of weight and body mass index on bone mineral density in men and women: the Framingham study. J Bone Miner Res [Internet]. 1993 [cited 2022 Apr 21];8(5):567–73. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8511983/
262. Reid IR, Plank LD, Evans MC. Fat mass is an important determinant of whole body bone density in premenopausal women but not in men. J Clin Endocrinol Metab [Internet]. 1992 [cited 2022 Apr 21];75(3):779–82. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1517366/
263. Ravn P, Cizza G, Bjarnason NH, Thompson D, Daley M, Wasnich RD, et al. Low

body mass index is an important risk factor for low bone mass and increased bone loss in early postmenopausal women. Early Postmenopausal Intervention Cohort (EPIC) study group. J Bone Miner Res [Internet]. 1999 [cited 2022 Apr 21];14(9):1622–7. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10469292/

264. Weiler HA, Janzen L, Green K, Grabowski J, Seshia MM, Yuen KC. Percent body fat and bone mass in healthy Canadian females 10 to 19 years of age. Bone [Internet]. 2000 Aug [cited 2022 Apr 21];27(2):203–7. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10913912/
265. Goulding A, Taylor RW, Jones IE, McAuley KA, Manning PJ, Williams SM. Overweight and obese children have low bone mass and area for their weight. Int J Obes Relat Metab Disord [Internet]. 2000 [cited 2022 Apr 21];24(5):627–32. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10849586/
266. Pollock NK, Laing EM, Baile CA, Hamrick MW, Hall DB, Lewis RD. Is adiposity advantageous for bone strength? A peripheral quantitative computed tomography study in late adolescent females. Am J Clin Nutr [Internet]. 2007 Nov 1 [cited 2022 Apr 21];86(5):1530–8. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17991669/
267. Blum M, Harris SS, Must A, Naumova EN, Phillips SM, Rand WM, et al. Leptin, body composition and bone mineral density in premenopausal women. Calcif Tissue Int [Internet]. 2003 Jul 1 [cited 2022 Apr 21];73(1):27–32. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14506951/
268. Naveiras O, Nardi V, Wenzel PL, Hauschka P V., Fahey F, Daley GQ. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. Nature [Internet]. 2009 Jul 9 [cited 2022 Apr 21];460(7252):259–63. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19516257/
269. Rousière M, Michou L, Cornélis F, Orcel P. Paget's disease of bone. Best Pract Res Clin Rheumatol [Internet]. 2003 [cited 2022 Apr 21];17(6):1019–41. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15123049/
270. Helfrich MH, Hocking LJ. Genetics and aetiology of Pagetic disorders of bone. Arch Biochem Biophys [Internet]. 2008 May 15 [cited 2022 Apr 21];473(2):172–82. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18359282/
271. Singer FR. Paget disease: when to treat and when not to treat. Nat Rev Rheumatol [Internet]. 2009 [cited 2022 Apr 21];5(9):483–9. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19652650/
272. Siris ES. Extensive personal experience: Paget's disease of bone. J Clin Endocrinol Metab [Internet]. 1995 [cited 2022 Apr 21];80(2):335–8. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7852484/
273. Michou L, Chamoux E, Couture J, Morissette J, Brown JP, Roux S. Gene expression profile in osteoclasts from patients with Paget's disease of bone. Bone [Internet]. 2010 Mar [cited 2022 Apr 21];46(3):598–603. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19925894/
274. Del Fattore A, Cappariello A, Teti A. Genetics, pathogenesis and complications of osteopetrosis. Bone [Internet]. 2008 Jan [cited 2022 Apr 21];42(1):19–29. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17936098/
275. Whyte MP, McAlister WH, Zhang F, Bijanki VN, Nenninger A, Gottesman GS, et al. New explanation for autosomal dominant high bone mass: Mutation of low-density lipoprotein receptor-related protein 6. Bone [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2022 May 30];127:228–43. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31085352/
276. Brance ML, Brun LR, Cóccaro NM, Aravena A, Duan S, Mumm S, et al. High bone mass from mutation of low-density lipoprotein receptor-related protein 6 (LRP6). Bone [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2022 May 30];141. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32730923/

277. Lips P, Van Schoor NM, Bravenboer N. Chapter 71. Vitamin D–Related Disorders. Prim Metab Bone Dis Disord Miner Metab Seventh Ed [Internet]. 2009 Dec 23 [cited 2022 Apr 21];329–35. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/9780470623992.ch71
278. Van Dijk FS, Pals G, Van Rijn RR, Nikkels PGJ, Cobben JM. Classification of Osteogenesis Imperfecta revisited. Eur J Med Genet [Internet]. 2010 Jan [cited 2022 Apr 21];53(1):1–5. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19878741/
279. Glorieux FH. Osteogenesis imperfecta. Best Pract Res Clin Rheumatol [Internet]. 2008 Mar [cited 2022 Apr 21];22(1):85–100. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18328983/
280. Sakellariou VI, Grigoriou E, Mavrogenis AF, Soucacos PN, Papagelopoulos PJ. Heterotopic ossification following traumatic brain injury and spinal cord injury: insight into the etiology and pathophysiology. J Musculoskelet Neuronal Interact. 2012;14(4):230–40.
281. Pedersen SJ, Praveena C, Lambert RGW, Østergaard M, Maksymowych WP. Resolution of inflammation following treatment of ankylosing spondylitis is associated with new bone formation. J Rheumatol [Internet]. 2011 Jul [cited 2022 Apr 18];38(7):1349–54. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21459937/
282. Chiowchanwisawakit P, Lambert RGW, Conner-Spady B, Maksymowych WP. Focal fat lesions at vertebral corners on magnetic resonance imaging predict the development of new syndesmophytes in ankylosing spondylitis. Arthritis Rheum [Internet]. 2011 Aug [cited 2022 Apr 18];63(8):2215–25. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21484769/
283. DeLee J, Ferrari A, Charnley J. Ectopic bone formation following low friction arthroplasty of the hip. Clin Orthop Relat Res. 1976;121:53–9.
284. Edwards DS, Clasper JC. Heterotopic ossification: a systematic review. J R Army Med Corps [Internet]. 2015 Dec 1 [cited 2022 Mar 15];161(4):315–21. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25015927/
285. Zhou L, Gee SM, Hansen JA, Posner MA. Heterotopic Ossification After Arthroscopic Procedures: A Scoping Review of the Literature. Orthop J Sport Med [Internet]. 2022 Jan 17 [cited 2022 Mar 15];10(1). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35071654/
286. Ahrengart L. Periarticular Heterotopic Ossification After Total Hip Arthroplasty Risk Factors and Consequences. 1Clinical Orthop Relat Res. 1991;263:49–58.
287. EM S, M X, GJ F, DA F, TJ C, IH C, et al. A recurrent mutation in the BMP type I receptor ACVR1 causes inherited and sporadic fibrodysplasia ossificans progressiva. Nat Genet [Internet]. 2006 May [cited 2022 Apr 19];38(5):525–7. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16642017/
288. Kaplan FS, Shore EM. Progressive osseous heteroplasia. J Bone Miner Res. 2000;15(11):2084–94.
289. Kaplan FS, Al Mukaddam M, Baujat G, Brown M, Cali A, Cho T-J, et al. THE MEDICAL MANAGEMENT OF FIBRODYSPLASIA OSSIFICANS PROGRESSIVA: CURRENT TREATMENT CONSIDERATIONS From The International Clinical Council on FOP (ICC) & Consultants. Proc Intl Clin Counc FOP. 2019;1:1–111.
290. Lo TCM, Healy WL, Covall DJ, Dotter WE, Pfeifer BA, Torgerson WR, et al. Heterotopic bone formation after hip surgery: prevention with single-dose postoperative hip irradiation. Radiology [Internet]. 1988 [cited 2022 Mar 15];168(3):851–4. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3136510/
291. Chidel MA, Suh JH, Matejczyk MB. Radiation prophylaxis for heterotopic ossification of the knee. J Arthroplasty [Internet]. 2001 Jan [cited 2022 Apr 19];16(1):1–6.

Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11172262/
292. Liu JZ, Frisch NB, Barden RM, Rosenberg AG, Silverton CD, Galante JO. Heterotopic Ossification Prophylaxis After Total Hip Arthroplasty: Randomized Trial of 400 vs 700 cGy. J Arthroplasty [Internet]. 2017 Apr 1 [cited 2022 Apr 19];32(4):1328–34. Available from: http://www.arthroplastyjournal.org/article/S0883540316307586/fulltext
293. Müseler AC, Grasmücke D, Jansen O, Aach M, Meindl R, Schildhauer TA, et al. In-hospital outcomes following single-dose radiation therapy in the treatment of heterotopic ossification of the hip following spinal cord injury—an analysis of 444 cases. Spinal Cord 2017 553 [Internet]. 2016 Jul 19 [cited 2022 Apr 19];55(3):244–6. Available from: https://www.nature.com/articles/sc2016112
294. Geller JS, Allegra PR, Seldon CS, Spieler BO, Cohen LL, Barnhill SW, et al. Primary Versus Secondary Radiotherapy for Heterotopic Ossification Prevention About the Elbow. J Orthop Trauma [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2022 Apr 19];36(2):E56–61. Available from: https://journals.lww.com/jorthotrauma/Fulltext/2022/02000/Primary_Versus_Secondary_Radiotherapy_for.12.aspx
295. Jensen AW, Viozzi CF, Foote RL. Long-Term Results of Radiation Prophylaxis for Heterotopic Ossification in the Temporomandibular Joint. J Oral Maxillofac Surg [Internet]. 2010 May 1 [cited 2022 Apr 19];68(5):1100–5. Available from: http://www.joms.org/article/S0278239109021648/fulltext
296. Sautter-Bihl ML, Hültenschmidt B, Liebermeister E, Nanassy A. Fractionated and single-dose radiotherapy for heterotopic bone formation in patients with spinal cord injury. A phase-I/II study. Strahlenther Onkol [Internet]. 2001 [cited 2022 Mar 15];177(4):200–5. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11370555/
297. Levy CE, Berner TF, Bendixen R. Rehabilitation for individuals with fibrodysplasia ossificans progressiva. Clin Rev Bone Miner Metab 2005 33 [Internet]. 2005 Sep [cited 2022 Apr 19];3(3):251–6. Available from: https://link.springer.com/article/10.1385/BMM:3:3-4:251
298. Ji C, Casinghino S, Chang DJ, Chen Y, Javed A, Ito Y, et al. CBFa(AML/PEBP2)-related elements in the TGF-β type I receptor promoter and expression with osteoblast differentiation. J Cell Biochem. 1998;69(3):353–63.
299. Doerfler W. DNA Methylation--A Regulatory Signal in Eukaryotic Gene Expression. J Gen Virol [Internet]. 1981 Nov 1 [cited 2018 Jun 14];57(1):1–20. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6275010
300. Jin B, Li Y, Robertson KD. DNA Methylation: Superior or Subordinate in the Epigenetic Hierarchy? https://doi.org/101177/1947601910393957 [Internet]. 2011 Jan 31 [cited 2021 Oct 7];2(6):607–17. Available from: https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1947601910393957
301. Antequera F. Structure, function and evolution of CpG island promoters. Cell Mol Life Sci [Internet]. 2003 Aug 1 [cited 2018 Jun 14];60(8):1647–58. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14504655
302. Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. 2011 May 15 [cited 2018 Jun 14];25(10). Available from: http://genesdev.cshlp.org/content/25/10/1010.full
303. Wan Y. PPARγ in bone homeostasis. Trends Endocrinol Metab [Internet]. 2010 Dec 1 [cited 2018 Jun 14];21(12):722–8. Available from: http://www.cell.com/article/S1043276010001384/fulltext
304. Letarouilly JG, Broux O, Clabaut A. New insights into the epigenetics of osteoporosis. Genomics [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2022 Apr 21];111(4):793–8. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29730394/

305. Li J, Zuo B, Zhang L, Dai L, Zhang X. Osteoblast versus Adipocyte: Bone Marrow Microenvironment-Guided Epigenetic Control. Case Reports Orthop Res [Internet]. 2018 Jun 7 [cited 2022 Apr 21];1(1):2–18. Available from: https://www.karger.com/Article/FullText/489053
306. Chen Y-SS, Wu R, Yang X, Kou S, MacDougald OA, Yu L, et al. Inhibiting DNA methylation switches adipogenesis to osteoblastogenesis by activating Wnt10a. 2016 May 3 [cited 2021 Oct 7];6(1):1–12. Available from: https://www.nature.com/articles/srep25283
307. Reznikoff CA, Brankow DW, Heidelberger2 C. Establishment and Characterization of a Cloned Line of C3H Mouse Embryo Cells Sensitive to Postconfluence Inhibition of Division1. 1973;
308. Zhao L, Gang AE, Ae L, Chan K-M, Yan AE, Ae W, et al. Comparison of Multipotent Differentiation Potentials of Murine Primary Bone Marrow Stromal Cells and Mesenchymal Stem Cell Line C3H10T1/2. Calcif Tissue Int. 2009;84:56–64.
309. Simonsen JL, Rosada C, Serakinci N, Justesen J, Stenderup K, Rattan SIS, et al. Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. Nat Biotechnol. 2002;20(6):592–6.
310. Abdallah BM, Haack-Sørensen M, Burns JS, Elsnab B, Jakob F, Hokland P, et al. Maintenance of differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene despite of extensive proliferation. Biochem Biophys Res Commun [Internet]. 2005 Jan 21 [cited 2021 Aug 4];326(3):527–38. Available from: www.elsevier.com/locate/ybbrc
311. Twine NA, Harkness L, Adjaye J, Aldahmash A, Wilkins MR, Kassem M. Molecular Phenotyping of Telomerized Human Bone Marrow Skeletal Stem Cells Reveals a Genetic Program of Enhanced Proliferation and Maintenance of Differentiation Responses. JBMR Plus [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2021 Aug 4];2(5):257–67. Available from: https://asbmr.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jbm4.10050
312. Rgen Fogh J;, Fogh JM, Orfeo T. One Hundred and Twenty-Seven Cultured Human Tumor Cell Lines Producing Tumors in Nude Mice 1.2.3. [cited 2021 Aug 4]; Available from: http://jnci.oxfordjournals.org/
313. Rodan SB, Imai Y, Thiede MA, Wesolowski G, Thompson D, Bar-Shavit Z, et al. Characterization of a Human Osteosarcoma Cell Line (Saos-2) with Osteoblastic Properties. Cancer Res. 1987;47(18):4961–6.
314. Czekanska EM, Stoddart MJ, Ralphs JR, Richards RG, Hayes JS. A phenotypic comparison of osteoblast cell lines versus human primary osteoblasts for biomaterials testing. J Biomed Mater Res - Part A [Internet]. 2014 Aug [cited 2017 Mar 14];102(8):2636–43. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.34937
315. Thomas DP, Sunters A, Gentry A, Grigoriadis AE. Inhibition of chondrocyte differentiation in vitro by constitutive and inducible overexpression of the c-fos proto-oncogene. J Cell Sci. 2000;113(3):439–50.
316. Levi B, James AW, Wan DC, Glotzbach JP, Commons GW, Longaker MT. Regulation of Human Adipose-Derived Stromal Cell Osteogenic Differentiation by Insulin-like Growth Factor-1 and Platelet-Derived Growth Factor-Alpha. Plast Reconstr Surg [Internet]. 2010 Jul [cited 2021 Aug 9];126(1):41. Available from: /pmc/articles/PMC3016898/
317. Nueda ML, García-Ramírez JJ, Laborda J, Baladrón V. dlk1 Specifically Interacts with Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 1 to Modulate Adipogenesis of 3T3-L1 Cells. J Mol Biol. 2008 Jun 6;379(3):428–42.
318. Wang FAN, Li H, Lou YIN, Xie J, Cao D, Huang X. Insulin - like growth factor I

promotes adipogenesis in hemangioma stem cells from infantile hemangiomas. 2019;2825–30.
319. Zhang Y, Liu M, Chen H, Zhu K, Feng W, Zhu D, et al. Associations between circulating bone-derived hormones lipocalin 2, osteocalcin, and glucose metabolism in acromegaly. J Endocrinol Invest. 2020 Mar 20;1–8.
320. Zhao P, Deng Y, Gu P, Wang Y, Zhou H, Hu Y, et al. Insulin-like growth factor 1 promotes the proliferation and adipogenesis of orbital adipose-derived stromal cells in thyroid-associated ophthalmopathy. Exp Eye Res. 2013 Feb 1;107:65–73.
321. MacDougald OA, Lane MD. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation [Internet]. Vol. 64, Annual Review of Biochemistry. Annual Reviews Inc.; 1995 [cited 2021 Jan 7]. p. 345–73. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7574486/
322. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JNM. Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. Bone Miner [Internet]. 1991 [cited 2021 Jan 8];14(1):27–40. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1868267/
323. Harada S -I, Matsumoto T, Ogata E. Role of ascorbic acid in the regulation of proliferation in osteoblast-like MC3T3-El cells. J Bone Miner Res [Internet]. 1991 [cited 2021 Jan 8];6(9):903–8. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1789137/
324. Franceschi RT, Iyer BS. Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells. J Bone Miner Res [Internet]. 1992 [cited 2021 Jan 8];7(2):235–46. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1373931/
325. Okazaki K, Yamaguchi T, Tanaka KI, Notsu M, Ogawa N, Yano S, et al. Advanced glycation end products (AGEs), but not high glucose, inhibit the osteoblastic differentiation of mouse stromal ST2 cells through the suppression of osterix expression, and inhibit cell growth and increasing cell apoptosis. Calcif Tissue Int. 2012;91(4):286–96.
326. Rajapakse CS, Johncola AJ, Batzdorf AS, Jones BC, Al Mukaddam M, Sexton K, et al. Effect of Low-Intensity Vibration on Bone Strength, Microstructure, and Adiposity in Pre-Osteoporotic Postmenopausal Women: A Randomized Placebo-Controlled Trial. J Bone Miner Res [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2021 Dec 14];36(4):673–84. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jbmr.4229
327. Gerstein MB, Kundaje A, Hariharan M, Landt SG, Yan K-KK, Cheng C, et al. Architecture of the human regulatory network derived from ENCODE data. 2012 Sep [cited 2021 Oct 7];489(7414):91–100. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22955619/
328. McCabe LR, Kockx M, Lian J, Stein J, Stein G. Selective Expression of fos- and jun-Related Genes during Osteoblast Proliferation and Differentiation. Exp Cell Res. 1995 May 1;218(1):255–62.
329. Gubelmann C, Schwalie PC, Raghav SK, Röder E, Delessa T, Kiehlmann E, et al. Identification of the transcription factor ZEB1 as a central component of the adipogenic gene regulatory network. Elife. 2014;3(August2014):1–30.
330. Hemming S, Cakouros D, Isenmann S, Cooper L, Menicanin D, Zannettino A, et al. EZH2 and KDM6A Act as an Epigenetic Switch to Regulate Mesenchymal Stem Cell Lineage Specification. Stem Cells [Internet]. 2014 Mar 1 [cited 2021 Oct 7];32(3):802–15. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/stem.1573
331. JB K, BM S. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. Genes Dev [Internet]. 1996 May 1 [cited

2021 Oct 7];10(9):1096–107. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8654925/
332. Laudes M, Bilkovski R, Oberhauser F, Droste A, Gomolka M, Leeser U, et al. Transcription factor FBI-1 acts as a dual regulator in adipogenesis by coordinated regulation of cyclin-A and E2F-4. J Mol Med 2008 865 [Internet]. 2008 Mar 27 [cited 2021 Oct 7];86(5):597–608. Available from: https://link.springer.com/article/10.1007/s00109-008-0326-2
333. Lu YH, Dallner OS, Birsoy K, Fayzikhodjaeva G, Friedman JM. Nuclear Factor-Y is an adipogenic factor that regulates leptin gene expression. Mol Metab. 2015 May 1;4(5):392–405.
334. Wang L, Jin Q, Lee J-E, Su I, Ge K. Histone H3K27 methyltransferase Ezh2 represses Wnt genes to facilitate adipogenesis. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 2010 Apr 20 [cited 2021 Oct 7];107(16):7317–22. Available from: https://www.pnas.org/content/107/16/7317
335. Clabaut A, Grare C, Rolland-Valognes G, Letarouilly JG, Bourrier C, Andersen TL, et al. Adipocyte-induced transdifferentiation of osteoblasts and its potential role in age-related bone loss. PLoS One [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2022 Apr 19];16(1):e0245014. Available from: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0245014
336. Duan M, Zhou B, Zhou X, Yuan G. Thiazolidinediones Inhibit Mouse Osteoblastic MC3T3-E1 Cell Proliferation in Part Through the Wnt Signaling Pathway. J Investig Med [Internet]. 2015 Jun 3 [cited 2021 Aug 11];63(5):758–64. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25756249/
337. Krishnan A, Nair S, Pillai M. Biology of PPAR gamma in cancer: a critical review on existing lacunae. Curr Mol Med [Internet]. 2007 Aug 30 [cited 2021 Aug 11];7(6):532–40. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17896990/
338. Yang Y, Wei H, Song T, Cai A, Zhou Y, Peng J, et al. E4BP4 mediates glucocorticoid-regulated adipogenesis through COX2. Mol Cell Endocrinol [Internet]. 2017 Jul 15 [cited 2022 Apr 29];450:43–53. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2017.04.015
339. Dubuquoy L, Rousseaux C, Thuru X, Peyrin-Biroulet L, Romano O, Chavatte P, et al. Recent advances in basic science PPARG as a new therapeutic target in inflammatory bowel diseases. Gut [Internet]. 2006 [cited 2022 Apr 29];55:1341–9. Available from: www.gutjnl.com
340. Justicia-Grande AJ, Gómez-Ríal J, Rivero-Calle I, Pischedda S, Curras-Tuala MJ, Gómez-Carballa A, et al. Case Report: Two Monochorionic Twins With a Critically Different Course of Progressive Osseus Heteroplasia. Front Pediatr [Internet]. 2021 Jun 23 [cited 2022 Apr 4];9(June):1–9. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34249809/
341. Rauch A, Haakonsson AK, Madsen JGS, Larsen M, Forss I, Madsen MR, et al. Osteogenesis depends on commissioning of a network of stem cell transcription factors that act as repressors of adipogenesis. Nat Genet [Internet]. 2019 Mar 4 [cited 2022 Apr 5];51(4):716–27. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41588-019-0359-1
342. Ciuffreda MC, Malpasso G, Musarò P, Turco V, Gnecchi M. Protocols for in vitro differentiation of human mesenchymal stem cells into osteogenic, chondrogenic and adipogenic lineages. In: Methods in Molecular Biology [Internet]. Humana Press Inc.; 2016 [cited 2021 Jan 31]. p. 149–58. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-3584-0_8
343. Hanna H, Mir LM, Andre FM. In vitro osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells generates cell layers with distinct properties. Stem Cell Res Ther [Internet].

2018 Jul 27 [cited 2021 Feb 3];9(1):203. Available from: https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-018-0942-x
344. Lee M-JJ, Fried SK. Optimal Protocol for the Differentiation and Metabolic Analysis of Human Adipose Stromal Cells [Internet]. Methods in Enzymology Academic Press Inc.; 2014 p. 49–65. Available from: /pmc/articles/PMC4336794/?report=abstract
345. Reed BC, Lane MD. Insulin receptor synthesis and turnover in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 1980 [cited 2021 Jan 12];77(1):285–9. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6928620/
346. Ye H, Serrero G. Stimulation of adipose differentiation related protein (ADRP) expression by ibuprofen and indomethacin in adipocyte precursors and in adipocytes. Biochem J [Internet]. 1998 Mar 1 [cited 2021 Jan 8];330(2):803–9. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9480894/
347. Liu B, Lu Y, Wang Y, Ge L, Zhai N, Han J. A protocol for isolation and identification and comparative characterization of primary osteoblasts from mouse and rat calvaria. Cell Tissue Bank [Internet]. 2019 [cited 2021 Feb 3];20(2):173. Available from: /pmc/articles/PMC6556159/?report=abstract
348. LI X. BMP Signaling and Skeletogenesis. Ann N Y Acad Sci [Internet]. 2006 Apr 1 [cited 2021 Jan 31];1068(1):26–40. Available from: http://doi.wiley.com/10.1196/annals.1346.006
349. Rahman MS, Akhtar N, Jamil HM, Banik RS, Asaduzzaman SM. TGF-β/BMP signaling and other molecular events: Regulation of osteoblastogenesis and bone formation [Internet]. Vol. 3, Bone Research. Sichuan University; 2015 [cited 2021 Jan 31]. p. 15005. Available from: /pmc/articles/PMC4472151/?report=abstract
350. Reddi AH. Cell Biology and Biochemistry of Endochondral Bone Development. Coll Relat Res [Internet]. 1981 [cited 2021 Jan 31];1(2):209–26. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7049548/
351. Yu B, Huo L, Liu Y, Deng P, Szymanski J, Li J, et al. PGC-1α Controls Skeletal Stem Cell Fate and Bone-Fat Balance in Osteoporosis and Skeletal Aging by Inducing TAZ. Cell Stem Cell [Internet]. 2018 Aug 2 [cited 2021 Feb 3];23(2):193-209.e5. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30017591/
352. Gossiel F, Altaher H, Reid DM, Roux C, Felsenberg D, Glüer CC, et al. Bone turnover markers after the menopause: T-score approach. Bone [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2021 Feb 3];111:44–8. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29551751/
353. Noer A, Sørensen AL, Boquest AC, Collas P. Stable CpG Hypomethylation of Adipogenic Promoters in Freshly Isolated, Cultured, and Differentiated Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue. https://doi.org/101091/mbc.e06-04-0322 [Internet]. 2006 Jun 7 [cited 2021 Oct 7];17(8):3543–56. Available from: https://www.molbiolcell.org/doi/abs/10.1091/mbc.e06-04-0322
354. Dungen MW van den, Murk AJ, Kok DE, Steegenga WT. Comprehensive DNA Methylation and Gene Expression Profiling in Differentiating Human Adipocytes. J Cell Biochem [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2021 Oct 7];117(12):2707–18. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcb.25568
355. Chen Q, Shou P, Zheng C, Jiang M, Cao G, Yang Q, et al. Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? Cell Death Differ [Internet]. 2016 Jul 1 [cited 2018 Jun 14];23(7):1128–39. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26868907
356. Gimble JM, Zvonic S, Floyd ZE, Kassem M, Nuttall ME. Playing with bone and fat. J Cell Biochem [Internet]. 2006 May 15 [cited 2022 May 11];98(2):251–66. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcb.20777
357. Duque G. Bone and fat connection in aging bone. Curr Opin Rheumatol [Internet]. 2008 Jul [cited 2022 May 11];20(4):429–34. Available from:

https://journals.lww.com/co-rheumatology/Fulltext/2008/07000/Bone_and_fat_connection_in_aging_bone.10.aspx
358. Tencerova M, Kassem M. The Bone Marrow-Derived Stromal Cells: Commitment and Regulation of Adipogenesis. Front Endocrinol (Lausanne) [Internet]. 2016 Sep 21 [cited 2022 May 11];7(SEP). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27708616/
359. Zhou J, Sears RL, Xing X, Zhang B, Li D, Rockweiler NB, et al. Tissue-specific DNA methylation is conserved across human, mouse, and rat, and driven by primary sequence conservation.
360. Hsu CN, Jen CY, Chen YH, Peng SY, Wu SC, Yao CL. Glucocorticoid transiently upregulates mitochondrial biogenesis in the osteoblast. Chin J Physiol [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2022 May 11];63(6):286–93. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33380613/
361. Baar K. Involvement of PPAR gamma co-activator-1, nuclear respiratory factors 1 and 2, and PPAR alpha in the adaptive response to endurance exercise. Proc Nutr Soc [Internet]. 2004 May [cited 2022 May 11];63(2):269–73. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15294042/
362. Chen YC, Yu YH. The potential of brown adipogenesis and browning in porcine bone marrow-derived mesenchymal stem cells1. J Anim Sci [Internet]. 2018 Sep 7 [cited 2022 May 11];96(9):3635–44. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29878130/
363. Xing W, Singgih A, Kapoor A, Alarcon CM, Baylink DJ, Mohan S. Nuclear factor-E2-related factor-1 mediates ascorbic acid induction of osterix expression via interaction with antioxidant-responsive element in bone cells. J Biol Chem [Internet]. 2007 Jul 27 [cited 2022 May 11];282(30):22052–61. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17510056/
364. Inoue K, Imai Y. Identification of Novel Transcription Factors in Osteoclast Differentiation Using Genome-wide Analysis of Open Chromatin Determined by DNase-seq. J Bone Miner Res [Internet]. 2014 [cited 2022 Apr 25];29(8):1823–32. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24677342/
365. Zhang Y, Sun ZW, Iratni R, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Hampsey M, et al. SAP30, a Novel Protein Conserved between Human and Yeast, Is a Component of a Histone Deacetylase Complex. Mol Cell. 1998 Jun 1;1(7):1021–31.
366. Halder D, Lee C-H, Young Hyun J, Chang G-E, Cheong E, Shin I. Suppression of Sin3A activity promotes differentiation of pluripotent cells into functional neurons OPEN. 2017 [cited 2022 May 10]; Available from: www.nature.com/scientificreports
367. Wiper-Bergeron N, Wu D, Pope L, Schild-Poulter C, Haché RJGG. Stimulation of preadipocyte differentiation by steroid through targeting of an HDAC1 complex. 2003 May 1 [cited 2019 Sep 18];22(9). Available from: http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1093/emboj/cdg218
368. Schultz DC, Ayyanathan K, Negorev D, Maul GG, Rauscher FJ. SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. Genes Dev [Internet]. 2002 Apr 15 [cited 2022 May 11];16(8):919–32. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11959841/
369. Zhang J, Matsumura Y, Kano Y, Yoshida A, Kawamura T, Hirakawa H, et al. Ubiquitination-dependent and -independent repression of target genes by SETDB1 reveal a context-dependent role for its methyltransferase activity during adipogenesis. Genes to Cells. 2021 Jul 1;26(7):513–29.
370. Matsumura Y, Nakaki R, Inagaki T, Yoshida A, Kano Y, Kimura H, et al.

H3K4/H3K9me3 Bivalent Chromatin Domains Targeted by Lineage-Specific DNA Methylation Pauses Adipocyte Differentiation. Mol Cell [Internet]. 2015 Nov 19 [cited 2022 May 10];60(4):584–96. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.025

371. Takada I, Mihara M, Suzawa M, Ohtake F, Kobayashi S, Igarashi M, et al. A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signalling suppresses PPAR-γ transactivation. Nat Cell Biol. 2007;9(11):1273–85.
372. Barral A, Pozo G, Ducrot L, Papadopoulos GL, Sauzet S, Oldfield AJ, et al. SETDB1/NSD-dependent H3K9me3/H3K36me3 dual heterochromatin maintains gene expression profiles by bookmarking poised enhancers. Mol Cell [Internet]. 2022 Feb 17 [cited 2022 May 11];82(4):816-832.e12. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35081363/
373. Hagen G, Müller S, Beato M, Suske G. Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes. Nucleic Acids Res [Internet]. 1992 Nov 11 [cited 2022 May 11];20(21):5519. Available from: /pmc/articles/PMC334381/?report=abstract
374. Hong J, Samudio I, Liu S, Abdelrahim M, Safe S. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Dependent Activation of p21 in Panc-28 Pancreatic Cancer Cells Involves Sp1 and Sp4 Proteins. 2004 [cited 2022 May 10]; Available from: www.endo-society.org
375. Wu H, Gordon JAR, Whitfield TW, Tai PWL, van Wijnen AJ, Stein JL, et al. Chromatin dynamics regulate mesenchymal stem cell lineage specification and differentiation to osteogenesis. Biochim Biophys acta Gene Regul Mech [Internet]. 2017 Apr 1 [cited 2022 May 11];1860(4):438–49. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28077316/
376. Dudakovic A, Camilleri ET, Paradise CR, Samsonraj RM, Gluscevic M, Paggi CA, et al. Enhancer of zeste homolog 2 (Ezh2) controls bone formation and cell cycle progression during osteogenesis in mice. J Biol Chem [Internet]. 2018 Aug 17 [cited 2022 May 3];293(33):12894–907. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29899112/
377. Dudakovic A, Samsonraj RM, Paradise CR, Galeano-Garces C, Mol MO, Galeano-Garces D, et al. Inhibition of the epigenetic suppressor EZH2 primes osteogenic differentiation mediated by BMP2. J Biol Chem [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2022 May 3];295(23):7877–93. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32332097/
378. Wang Y, Deng P, Liu Y, Wu Y, Chen Y, Guo Y, et al. Alpha-ketoglutarate ameliorates age-related osteoporosis via regulating histone methylations. Nat Commun [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2022 May 11];11(1). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33154378/
379. Hinney A, Ziegler A, Oeffner F, Wedewardt C, Vogel M, Wulftange H, et al. Independent Confirmation of a Major Locus for Obesity on Chromosome 10. J Clin Endocrinol Metab [Internet]. 2000 Aug 1 [cited 2021 Oct 7];85(8):2962–5. Available from:https://academic.oup.com/jcem/article/85/8/2962/2854364
380. Postigo AA. Opposing functions of ZEB proteins in the regulation of the TGFβ/BMP signaling pathway. EMBO J [Internet]. 2003 May 15 [cited 2021 Oct 7];22(10):2443–52. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1093/emboj/cdg225
381. Takagi T, Moribe H, H K, Y H. DeltaEF1, a zinc finger and homeodomain transcription factor, is required for skeleton patterning in multiple lineages. Development. 1998;125:21–31.
382. Gheldof A, Hulpiau P, van Roy F, De Craene B, Berx G. Evolutionary functional

analysis and molecular regulation of the ZEB transcription factors. Cell Mol Life Sci 2012 6915 [Internet]. 2012 Feb 21 [cited 2021 Oct 7];69(15):2527–41. Available from: https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-012-0935-3

383. Postigo AA, Depp JL, Taylor JJ, Kroll KL. Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins. EMBO J [Internet]. 2003 May 15 [cited 2021 Oct 7];22(10):2453–62. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1093/emboj/cdg226
384. Índice de masa corporal según grupos de edad y periodo. [Internet]. [cited 2022 May 11]. Available from: https://www.ine.es/jaxi/Datos.htm?path=/t00/mujeres_hombres/tablas_1/l0/&file=d06001.px#!tabs-grafico
385. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). J Biol Chem [Internet]. 1995 Jun 2 [cited 2022 May 11];270(22):12953–6. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7768881/
386. Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM, Kliewer SA. Peroxisome Proliferator-activated Receptors alpha and gamma Are Activated by Indomethacin and Other Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs. J Biol Chem [Internet]. 1997 Feb 7 [cited 2018 Jun 14];272(6). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9013583/
387. Agarwal S, Drake J, Qureshi AT, Loder S, Li S, Shigemori K, et al. Characterization of Cells Isolated from Genetic and Trauma-Induced Heterotopic Ossification. PLoS One [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2022 May 11];11(8):e0156253. Available from: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0156253

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

MUSCULO-SKELETAL PATHOLOGY

El aumento mundial de las patologías musculoesqueléticas (PME) supone un alto coste sociosanitario y económico. Las alteraciones del hueso son una constante en ellas. Una diferenciación osteoblástica ineficaz es inherente a muchas PMEs. Aunque la osteoblastogénesis y la adipogénesis son procesos en equilibrio y mutuamente regulados, el mecanismo regulatorio de los factores de transcripción implicados en la primera no se conoce tan profundamente como la segunda. En este trabajo desarrollamos un método in vitro mejorado para estudiar la regulación del balance entre osteoblastogénesis y adipogénesis. Utilizando este conocimiento buscamos identificar los mecanismos íntimos de la regulación de la osteoblastogénesis, con el objetivo de desarrollar nuevas herramientas terapéuticas dirigidas al crecimiento anómalo de hueso.