



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

DIVISIÓN DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**“EL ÁCIDO RETINOICO Y LA PROTEÍNA
MORFOGENÉTICA DE HUESO 2 INDUCEN
CONJUNTAMENTE LA OSTEOGÉNESIS EN DOS
CLONAS DE PREADIPOCITOS 3T3”**

Tesis que presenta

L. en C. (BQ) Candy Yuriria Ramírez Zavaleta

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

En la especialidad de

Biología Molecular

Bajo la dirección de

Dr. Luis Antonio Salazar Olivo

San Luis Potosí, S.L.P., 19 de enero del 2007



La tesis “El ácido retinoico y la proteína morfogenética de hueso 2 inducen conjuntamente la osteogénesis en dos clonas de preadipocitos 3T3” fue elaborada por la Licenciada en Ciencias (Bioquímica) Candy Yuriria Ramírez Zavaleta y aprobada el 19 de Enero del 2007 por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Luis Antonio Salazar Olivo

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro

Dr. Rubén López Revilla



Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Luis Antonio Salazar Olivo. El trabajo fue financiado parcialmente con fondos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT SEP-2004-C01-45804/A-1) otorgados al Dr. Salazar Olivo. Durante la realización del mismo la autora recibió la beca académica No. 188844 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 031 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 19 días del mes de enero del año 2007, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro	Presidenta	IPICYT
Dr. Rubén López Revilla	Secretario	IPICYT
Dr. Luis Antonio Salazar Olivo	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Candy Yuriria Ramírez Zavaleta

sobre la Tesis intitulada:

El Ácido Retinoico y la Proteína Morfogenética de Hueso 2 Inducen Conjuntamente la Osteogénesis en dos Clonas de Preadipocitos 3T3

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Luis Antonio Salazar Olivo

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 13:50 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 19 días del mes enero de 2007.

L.C.C. Ivonne Lizette Cuevas Velez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

Dr. Marcial Borilla Marín
Secretario Académico



A

PAPÁ, MAMÁ, HERMANOS Y JOSEFAT

AGRADECIMIENTOS

A mi familia que me ama y apoya siempre

Al Dr. Luis Antonio Salazar Olivo por asesorarme en este trabajo

A Josefát Gregorio Jorge, una de las personas más brillantes que conozco, gracias por tus valiosísimas sugerencias, ideas, estrategias y artículos

A la M. en C. Jaqueline Juárez Cepeda por su amistad, consejos, apoyo y valioso entrenamiento en el análisis de expresión génica, aprendí muchísimo

A mis sinodales Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro y Dr. Rubén López Revilla por sus comentarios a esta tesis

A mi mejor amiga Ana por su cariño y apoyo desde Cuernavaca

A mis compañeros Alejandro Juárez Reyes, Bernardo Bañuelos Hernández, Francisco Bautista Cruz y Pedro Armando Ojeda May, grandes estudiantes, personas y amigos

Al Dr. J. Sergio Casas Flores con cariño y respeto por su amistad, apoyo y consejos

A mis compañeros y amigos del grupo de laboratorio Rebeca Mejía Elizondo, Angel Josabad Alonso Castro, Mireya Liliana Herrera Herrera, Mayte Guadalupe Cervantes Badillo y Rocío Zapata Bustos por su cariño y apoyo

A la I.A.Z. Cytllalic Rangel del Camino, a la Biol. Mireya Sánchez Garza y a la Ing. Adriana Lomelí Forcada por el apoyo técnico que me brindaron

ÍNDICE

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE LA TESIS	2
CRÉDITOS INSTITUCIONALES	3
DEDICATORIAS	4
AGRADECIMIENTOS	5
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMEN	10
ABSTRACT	11

INTRODUCCIÓN

Los adipocitos y las células troncales mesenquimales	12
Diferenciación adiposa	12
Eventos transcripcionales de la diferenciación adiposa	13
Los preadipocitos 3T3-F442A y 3T3-F442A/C4	13
Diferenciación osteogénica	14
Eventos transcripcionales de la diferenciación osteogénica	15
Transdiferenciación de linajes mesenquimales	15
La vía de señalización de las BMPs	16
Los inhibidores de HDACs	16
El AR y la BMP -2	17

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos celulares	19
Ensayos de proliferación de 3T3	19
Ensayos de adipogénesis	20
Determinación de la actividad de fosfatasa alcalina	21
Extracción de RNA total	22
RT-PCR convencional y semicuantitativa	22
Cuantificación del grado de mineralización de la matriz extracelular	24

Detección de proteoglicanos sulfatados y glicoproteínas carboxiladas	24
Análisis estadístico	25
RESULTADOS	
Los preadipocitos 3T3 expresan la vía de señalización de BMPs	26
Ni la BMP -2 ni la tricostatina A afectan la adipogénesis de 3T3, en tanto que la apicidina y el ácido valproico solo ejercen un efecto anti-adipogénico parcial	26
El AR y la BMP -2, pero no los iHDACs, inducen la actividad de fosfatasa alcalina en preadipocitos 3T3 mantenidos en condiciones osteogénicas	29
Los preadipocitos 3T3 sobre-expresan genes del linaje osteocítico en respuesta a AR y BMP-2	30
El AR y la BMP -2 inducen la mineralización de la matriz extracelular de los preadipocitos 3T3 pero no la acumulación de proteoglicanos sulfatados y glicoproteínas carboxiladas	32
DISCUSIÓN	34
REFERENCIAS	40
PIES DE FIGURAS	45
FIGURAS	51

LISTA DE FIGURAS

1. Diferenciación adiposa	51
2. Eventos transcripcionales de la diferenciación adiposa	52
3. Diferenciación osteogénica	53
4. La vía de señalización de BMP -2	54
5. Expresión de la vía de señalización de BMP -2 en preadipocitos 3T3	55
6. Efecto de BMP-2 e iHDACs sobre la supervivencia de preadipocitos 3T3	56
7. Efecto de BMP-2 e iHDACs sobre la acumulación lipídica de preadipocitos 3T3 mantenidos en medio adipogénico	57
8. Efecto de BMP-2 e iHDACs sobre la acumulación lipídica de preadipocitos 3T3 mantenidos en medio osteogénico	58
9. Efecto de BMP-2 e iHDACs sobre la actividad de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) de preadipocitos 3T3 mantenidos en medio adipogénico	59
10. Efecto de BMP -2 e iHDACs sobre la actividad de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) de preadipocitos 3T3 mantenidos en medio osteogénico	60
11. Efecto de BMP -2 e iHDACs sobre la actividad de fosfatasa alcalina de preadipocitos 3T3 mantenidos en medio adipogénico	61

12. Efecto de BMP -2 e iHDACs sobre la actividad de fosfatasa alcalina de preadipocitos 3T3 mantenidos en medio osteogénico	62
13. Cuantificación de la actividad de fosfatasa alcalina de preadipocitos 3T3 mantenidos en medio osteogénico con AR y BMP-2	63
14. Cinética de amplificación de los mRNAs para GAPDH, Runx2, fosfatasa alcalina (ALP) y osteocalcina (OC) en preadipocitos 3T3	64
15. Transcripción de Runx2, fosfatasa alcalina (ALP) y osteocalcina (OC) en preadipocitos 3T3 mantenidos en condiciones osteogénicas	65
16. Efecto de BMP -2 sobre la mineralización de la matriz extracelular de preadipocitos 3T3 mantenidos en medio osteogénico	66
17. Efecto de BMP -2 sobre la acumulación de proteoglicanos sulfatados y glicoproteínas carboxiladas en preadipocitos 3T3 mantenidos en medio osteogénico	67

RESUMEN

Las células troncales mesenquimales pueden diferenciarse en adipocitos, osteocitos, condrocitos o miocitos, aunque desconocemos como es que células que han iniciado la diferenciación en uno de estos linajes pueden transdiferenciarse en otro. Para determinar el potencial osteogénico de los preadipocitos 3T3-F442A y 3T3-F442A/C4, analizamos su respuesta a compuestos que inhiben la adipogénesis y estimulan la osteogénesis. En medio adipogénico adicionado con proteína morfogenética de hueso 2 (BMP -2), ambas líneas celulares mostraron un alto grado de diferenciación adiposa, evaluado por su acumulación lipídica o su actividad de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, aun en presencia de ácido retinoico (AR), un probado agente anti-adipogénico. En estas condiciones, los inhibidores de desacetilasas de histonas (iHDACs) apicidina y ácido valproico inhibieron ambos rasgos adipogénicos en 63% y 30%, respectivamente. La tricostatina A, otro iHDAC, no afectó la expresión de estos caracteres en ninguna de las dos líneas. En condiciones osteo-inductoras, el AR y la BMP-2 indujeron conjuntamente un incremento de ocho veces en la actividad de fosfatasa alcalina, un marcador intermedio de osteogénesis, en ambas clonas de preadipocitos. Este efecto no se observó con ninguno de los iHDACs ensayados. Asimismo, el AR y la BMP-2 indujeron la transcripción de los marcadores osteogénicos Runx2 (13 veces), fosfatasa alcalina (10 veces) y osteocalcina (17 veces), así como la mineralización de la matriz extracelular, un fenotipo de osteocitos maduros. En conclusión, nuestros resultados muestran que el AR y la BMP-2 inducen conjuntamente la osteogénesis en los preadipocitos 3T3-F442A y 3T3-F442A/C4, que este efecto no es ejercido en estas células por iHDACs a los que previamente se atribuyó tal capacidad y que ambas clonas de preadipocitos poseen similar potencial osteogénico.

Palabras clave: Preadipocitos 3T3, transdiferenciación, osteogénesis, BMP -2, ácido retinoico, inhibidores de desacetilasas de histonas

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells can differentiate into adipocytes, osteocytes, chondrocytes or myocytes, although it is unknown whether cells that have initiated the differentiation into one of these lineages can be transdifferentiated into another. To determine the osteogenic potential of 3T3-F442A and 3T3-F442A/C4 preadipocytes, we analyzed their response to compounds that inhibit adipogenesis and stimulate osteogenesis. In adipogenic medium supplemented with bone morphogenetic protein 2 (BMP-2), both cell lines showed a high degree of adipose conversion as assessed by lipid accumulation or glycerophosphate dehydrogenase activity, even in the presence of retinoic acid (RA), a proven antiadipogenic agent. Under these conditions, the histone deacetylase inhibitors (iHDACs) apicidin and valproic acid inhibited both adipogenic traits by 63% and 30%, respectively. Trichostatin A, another iHDAC, did not affect the expression of these characters in any of the two cell lines. In osteoinductive conditions, RA and BMP-2 cooperatively induced an eight-fold increase in alkaline phosphatase activity, an intermediate osteogenic marker, in both preadipocyte lines. This effect was not observed with any of the iHDACs assayed. RA and BMP-2 also induced the transcription of osteogenic markers Runx2 (13-fold), alkaline phosphatase (10-fold) and osteocalcin (17-fold), as well as the mineralization of extracellular matrix, a mature osteocytes phenotype. In summary, our results show that RA and BMP-2 cooperatively induce osteogenesis of 3T3-F442A and 3T3-F442A/C4 preadipocytes, that this effect is not exerted in these cells by iHDACs to which such capacity was previously attributed and that both preadipocyte lines possess a similar osteogenic potential.

Key words: 3T3 preadipocytes, transdifferentiation, osteogenesis, BMP-2, retinoic acid, histone deacetylase inhibitors

INTRODUCCIÓN

Los adipocitos y las células troncales mesenquimales

El tejido adiposo en animales es un tipo de tejido conectivo formado principalmente por células denominadas adipocitos, las cuales se derivan de las células troncales mesenquimales (MSCs) y se especializan en la acumulación intra-citoplásmica de triglicéridos. Además de su función en el almacenamiento de las reservas energéticas, los adipocitos secretan múltiples factores que influyen en el funcionamiento de diversos aspectos fisiológicos del organismo como la respuesta inmunológica, la función vascular y la regulación del apetito (Gregoire y cols, 1998). Además de los adipocitos, el tejido adiposo contiene células estromales -vasculares como fibroblastos, leucocitos, macrófagos y preadipocitos que mantienen su integridad estructural (Cinti, 2002). Las MSCs, por su parte, son células multipotentes que además de dar origen a los adipocitos, se diferencian en miocitos, condrocitos y osteocitos (Prockop, 1997; Pittenger y cols, 1999).

Diferenciación adiposa

In vitro, el desarrollo de las MSCs en adipocitos terminales puede dividirse en varias etapas. Primero, las MSCs se dividen de manera asimétrica, es decir, una célula hija permanece pluripotente para perpetuar la población de células troncales, mientras que la otra célula hija se compromete, por medio de una combinación de señales, a convertirse en preadipocito (Bowers y cols, 2006). Los preadipocitos generados (figura 1) proliferan hasta la confluencia y en este punto detienen su crecimiento. Los preadipocitos quiescentes son estimulados por una segunda combinación de señales que los compromete a convertirse en adipocitos y expandirse de forma clonal. Finalmente, estos preadipocitos comprometidos cambian drásticamente su forma alargada en esférica y comienzan a acumular lípidos en su citoplasma, hasta alcanzar la diferenciación terminal en adipocitos (Gregoire y cols, 1998).

Eventos transcripcionales de la diferenciación adiposa

Varias familias de factores de transcripción son reguladores clave del proceso de adipogénesis (figura 2). Los miembros de la familia de proteínas C/EBP (*CCAAT/enhancer-binding protein*) y PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor g*) transactivan genes específicos de adipocitos. La exposición de los preadipocitos confluentes a factores adipogénicos induce la expresión de C/EBP β y C/EBP δ , los que a su vez activan la expresión de PPAR γ y C/EBP α . La producción de 15-desoxi-delta 12, 14-prostaglandina J2, un ligando de PPAR γ , es un paso limitante en esta cascada transcripcional. Otro factor de transcripción clave en la regulación de la expresión de genes específicos de la adipogénesis es SREBP-1c/ADD1 (*sterol regulatory element binding protein-1c/adipocyte determination and differentiation factor 1*), pues se ha sugerido que regula la producción del ligando de PPAR γ al igual que C/EBP β y C/EBP δ . Durante la fase terminal de diferenciación, la activación de la cascada transcripcional conduce a un incremento en los niveles de mRNA y proteína de varias enzimas que participan en la síntesis de triacilglicerol, como la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) (Gregoire y cols, 1998).

Los preadipocitos 3T3-F442A y 3T3-F442A/C4

Las células 3T3-F442A (en lo sucesivo, F4) son una sub-población de la línea celular de fibroblastos de ratón suizo 3T3 (Todaro y Green, 1963) que tiene la capacidad de diferenciarse en adipocitos (Green y Kehinde, 1976). Esta diferenciación depende estrictamente de los factores adipogénicos de origen sérico suplementados al medio de cultivo. El suero fetal de bovino, por ejemplo, tiene una actividad adipogénica elevada, en tanto que el suero de gato adulto carece casi totalmente de dicha actividad (Kuri-Harcuch y Green, 1978). Además, existen otros agentes bien caracterizados como la insulina y la biotina que promueven la adipogénesis de F4. Por el contrario, concentraciones micromolares del ácido retinoico (AR) inhiben la adipogénesis de estas células, generando cambios en la morfología celular, pues las células se vuelven más elongadas y

aplanadas. El efecto inhibitorio del AR se manifiesta solo cuando las células se tratan antes del compromiso a la adipogénesis (Kuri-Harcuch, 1982).

La clona 3T3-F442A/C4 (en lo sucesivo, C4), una variante espontánea obtenida por selección de F4 con una alta concentración (0.1 mM) de AR (Salazar-Olivo y cols, 1994), presenta varias características que la distinguen de los preadipocitos F4 parentales. C4 posee una mayor sensibilidad a los factores adipogénicos séricos y a los efectos adipogénicos de la hormona de crecimiento, un menor tiempo de duplicación de la población y una menor actividad de algunas enzimas lipogénicas como G3PDH y enzima málica. Además, a diferencia de F4, los preadipocitos C4 tienen un menor tamaño, una apariencia celular más poliédrica y se despegan de la caja de cultivo en monocapas celulares cuando se tratan con tripsina. Esto último sugiere que las células C4 poseen un patrón diferente de producción y/o acumulación de la matriz extracelular (Salazar-Olivo y cols, 1994).

Diferenciación osteogénica

El uso de líneas celulares derivadas del hueso parietal de ratas y ratones ha permitido reconocer cuatro etapas principales en el proceso de diferenciación de MSCs en osteocitos (figura 3). Durante la fase inicial del proceso de osteogénesis las MSCs proliferan hasta alcanzar confluencia y luego se comprometen, por medio del factor de transcripción Runx2, para convertirse en preosteoblastos. Luego, estas células precursoras de osteoblastos proliferan clonalmente y cambian su morfología fusiforme en poliédrica. Después de esta etapa, las células detienen su crecimiento y comienzan a producir fosfatasa alcalina, una enzima que participa en la producción del fosfato de calcio necesario para la mineralización de la matriz extracelular. Finalmente, las células adquieren una morfología con proyecciones periféricas y secretan proteínas componentes de la matriz extracelular ósea, que permiten la mineralización de ésta (Stein y Lian, 1993).

Eventos transcripcionales de la diferenciación osteogénica

Aunque el control transcripcional de la diferenciación osteocítica está dominado por una vía de señalización no elucidada completamente, se sabe que incluye a Runx2 como pieza central. El factor transcripcional Runx2, inducido por BMP-2, es el marcador molecular más temprano conocido para la diferenciación a osteocitos y su transfección en la línea celular pluripotente C3H10T1/2 induce la actividad de fosfatasa alcalina. Asimismo, se sabe que los genes que codifican proteínas de matriz ósea como osteocalcina, osteopontina y colágena tipo I tienen sitios de unión a Runx2 en sus secuencias promotoras. Más aún, Runx2 induce la expresión de estos genes en C3H10T1/2, todos ellos considerados marcadores de osteocitos diferenciados terminalmente (Yamaguchi y cols 2000).

Transdiferenciación de linajes mesenquimales

Una visión detallada de los mecanismos que controlan la diferenciación de las MSCs hacia un destino mesenquimal permitiría comprender mejor las causas de padecimientos que resultan de alteraciones en esta regulación. De interés particular es la regulación de la diferenciación osteogénica y adiposa, debido a que en condiciones que llevan a la pérdida de hueso como la osteoporosis, la disminución de la masa ósea correlaciona con un incremento en el tejido adiposo café (Pei y Tontonoz, 2004), sugiriendo que los adipocitos se generan a expensas de los osteocitos.

Diversos estudios han sugerido que existe un cierto grado de plasticidad en el linaje mesenquimal. Por ejemplo, células de tejido adiposo humano obtenidas por lipo-aspiración pueden expresar, en cultivo, características adipogénicas, osteogénicas, miogénicas o condrogénicas (Zuk y cols, 2002). Otras evidencias muestran que la proteína morfogenética de hueso 2 (BMP-2) y el AR cooperan para inducir la diferenciación de preadipocitos en células similares a osteocitos (Skillington y cols, 2002), y que líneas celulares de preadipocitos pueden transdiferenciarse en células similares a miocitos de músculo liso (Abderrahim-Ferkoune y cols, 2004). No obstante, se desconoce hasta qué punto células que

han iniciado la diferenciación en un linaje mesenquimal pueden transdiferenciarse en otro.

La vía de señalización de las BMPs

Varios estudios han demostrado que las BMPs tienen funciones importantes en la diferenciación de osteoblastos y condroblastos, y por ende en la formación de hueso y cartílago (Wozney y cols, 1988; Harris y cols, 1994; Chen y cols, 1997). Se han clonado y caracterizado tres receptores membranales para BMPs: BMPR-IA, BMPR-IB y BMPR-II, los cuales pertenecen a la familia de receptores de TGF- β (*transforming growth factor- β*). Aunque las BMPs se unen tanto a los BMPRs tipo I como a los BMPRs tipo II, se requieren heterómeros de estos receptores para transducir la señal (Chen y cols, 1998). Los BMPR-IIs son cinasas que fosforilan a los BMPR-Is, después de la unión del ligando (figura 4). Luego, los BMPR-Is activan, también mediante fosforilación, a las proteínas citoplásmicas Smad 1 y 5, las cuales forman un complejo con Smad4. Este complejo es posteriormente translocado al núcleo, donde interactúa con factores de transcripción como Runx2 (Chen y cols, 1998, Fujii y cols, 1999).

Los inhibidores de HDACs

Los inhibidores de desacetilasas de histonas (iHDACs) son un grupo de compuestos anti-cancerígenos que matan efectivamente células tumorales, pues se piensa que reactivan la expresión de genes supresores de tumores (Vavrova y cols, 2005). Existe evidencia que muestra que el ácido valproico (VPA), un inhibidor de HDACs usado en el tratamiento de la epilepsia, inhibe la diferenciación adiposa de preadipocitos de ratón y de humano (Lagace y Nachtigal, 2004). Más aún, se ha mostrado también que el VPA y la tricostatina A (TSA), uno de los inhibidores más potentes de HDACs, inducen la diferenciación osteocítica de células estromales de tejido adiposo y de la médula ósea (Cho y cols, 2005).

El AR y la BMP-2

Varios reportes han mostrado que el AR y la BMP-2 regulan la adipogénesis y la osteogénesis en diversos sistemas celulares (Skillington y cols, 2002; Song y cols, 2005). El AR es un inhibidor probado de la adipogénesis de preadipocitos F4, C4 y 3T3-L1 (Kuri-Harcuch, 1982, Salazar-Olivo y cols, 1994, Schwarz y cols, 1997). Así también, se ha visto que este compuesto promueve la diferenciación de osteoblastos primarios *in vitro* al incrementar la expresión de marcadores osteogénicos e inducir la formación de nódulos de osificación (Song y cols, 2005). Similarmente, la BMP-2 es un inductor potente de la formación de hueso (Chen y cols, 2004) y coopera con el AR para promover la osteogénesis de preadipocitos F4 (Skillington y cols, 2002). Interesantemente, la BMP-2 induce *per se* la expresión de marcadores de osteogénesis y de adipogénesis en preadipocitos 3T3 (Ji y cols, 2000). Estos resultados sugieren que el AR y la BMP-2 tienen la capacidad de inhibir la adipogénesis mientras promueven la osteogénesis de células mesenquimales.

Se sabe que los preadipocitos F4 expresan marcadores osteogénicos en respuesta a AR y BMP-2 (Skillington y cols, 2002), sin embargo, desconocemos si los preadipocitos C4, con menor actividad de algunas enzimas lipogénicas y morfología más poliédrica que F4 (Salazar-Olivo y cols, 1994), tienen este potencial. A fin de evaluar el potencial osteogénico de las líneas de preadipocitos F4 y C4, caracterizamos su respuesta a compuestos que inhiben la adipogénesis y promueven la osteogénesis. Nuestros resultados muestran que los iHDACs poseen diferente capacidad anti-adipogénica en ambas clonas de preadipocitos y son incapaces de inducir la expresión de fosfatasa alcalina, un marcador intermedio de osteogénesis. Por el contrario, en medio osteo-inductor, la BMP-2 y el AR inducen de manera conjunta la expresión de marcadores osteogénicos en los preadipocitos F4 y C4. Esta transdiferenciación se caracteriza por la sobre-expresión de marcadores de osteogénesis como Runx2, un marcador temprano, fosfatasa alcalina, un marcador intermedio y osteocalcina, un marcador tardío. Además de la sobre-expresión del gen de fosfatasa alcalina, la BMP-2 y el AR inducen un aumento en la actividad de esta enzima y más aún en el grado de

mineralización de la matriz extracelular de ambas clonas de preadipocitos 3T3. En general, la inducción de los marcadores osteogénicos por AR y BMP -2 fue similar en ambas clonas de preadipocitos, descartando la posibilidad de que la clona C4 represente un mejor modelo para estudiar la transdiferenciación osteocítica de los preadipocitos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos Celulares

Los preadipocitos F4 y C4 se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) suplementado con suero de ternera al 7% (HyClone; Logan, UT, USA) y se sub-cultivaron en preconfluencia cosechándolos con tripsina al 0.15%. La adipogénesis de los preadipocitos 3T3 se ensayó cultivándolos en DMEM adicionado con suero de ternera al 7%, 5 µg/ml de insulina y 1 µM de biotina (medio adipogénico; MA). Para evaluar el porcentaje de acumulación lipídica algunos cultivos se mantuvieron en DMEM adicionado con suero de gato adulto al 3%, 5 µg/ml de insulina y 1 µM de biotina (medio no adipogénico; MNA) (Kuri-Harcuch y Green, 1978). El potencial osteogénico de los preadipocitos 3T3 se ensayó en DMEM adicionado con suero de ternera al 7%, 100 µg/ml de ácido ascórbico y 5 mM de β-glicerofosfato (medio osteogénico; MO). Todos los suplementos de los medios, excepto el DMEM y el suero de ternera fueron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El AR se utilizó a 1 µM. La BMP-2 (PeproTech Inc.; Rocky Hill, NJ, USA) se usó a 3.8 nM. La apicidina fue donada amablemente por el Dr. Yin-Won Lee de la Universidad Nacional de Seúl y se utilizó a 80 nM, el ácido valproico se usó a 1 mM y la tricostatina A se usó a 5 nM, ambos de Calbiochem (San Diego, CA, USA). Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y cambios de medio cada tercer día.

Ensayos de proliferación de 3T3

Para determinar los efectos de la BMP-2 y los iHDACs sobre la supervivencia celular, preadipocitos F4 y C4 se inocularon en placas de 24 pozos (Costar; Corning, NY, USA) a una densidad de 1×10^4 células/cm² en DMEM adicionado con suero de ternera al 7% (medio basal; MB). Después de 48 h, los cultivos se trataron con diferentes concentraciones de AR, BMP-2 e iHDACs en MB. La supervivencia celular se evaluó mediante recuentos celulares realizados por duplicado en un hematímetro.

Ensayos de adipogénesis

La diferenciación adiposa de las células 3T3 se evaluó cuantificando la acumulación lipídica de monocapas celulares teñidas con una solución saturada de rojo oleoso O (Sigma-Aldrich) (Ramírez-Zacarías y cols, 1992). El 100% de diferenciación adiposa se estimó restando la absorbencia obtenida en el tratamiento con MNA (acumulación lipídica de fondo) a la absorbencia del tratamiento con MA. El porcentaje de diferenciación en los tratamientos restantes se estimó mediante la fórmula:

$$\% \text{ de diferenciación} = \frac{AbsT - AbsMNA}{AbsMA - AbsMNA} \times 100$$

donde *AbsT* es la absorbencia del tratamiento respectivo, *AbsMNA* es la absorbencia del tratamiento en MNA, y *AbsMA* es la absorbencia del tratamiento con MA. Como un criterio adicional de adipogénesis se determinó la actividad de glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.8; G3PDH) (Salazar-Olivo y cols, 1995), una enzima que participa en la síntesis de triglicéridos. Cultivos de los diferentes tratamientos se incubaron a 4°C durante 5 min. Las monocapas celulares se lavaron con PBS frío y se cosecharon con un gendarme de hule y 200 µl de amortiguador de extracción (50 mM de Tris/HCl, pH 7.4, 1 mM de EDTA y 1 mM de 2-mercaptoetanol). Las suspensiones celulares se sonicaron, se centrifugaron a 12,000 g y se recuperaron los sobrenadantes. La concentración proteína se cuantificó por el método de Bradford usando albúmina sérica bovina como estándar. La mezcla de reacción se preparó con 0-695 µl de amortiguador de extracción, 200 µl de 1.2 mM de NADH y 3-20 µg de proteína, según el grado de diferenciación adiposa alcanzado. La reacción se inició agregando 100 µl de 2 mM de DHAP (el volumen final de la mezcla fue de 1 ml) y se incubó el tiempo correspondiente al grado de diferenciación adiposa. La reacción se detuvo agregando 100 µl de SDS al 20% y se leyó a 340 nm. La actividad enzimática se calculó en nmoles de NADH/min/mg de proteína, por medio de la fórmula:

$$Actividad = \frac{AbsTo - AbsTn}{\epsilon M_{340nm} NADP} \times \frac{1}{longitud(cm)} \times \frac{volumen(ml)}{mg\ proteína}$$

en la que se consideró un coeficiente de extinción molar para el NADH a 340 nm (ϵM_{340nm}) de 6.22×10^{-3} nmoles/cm/mg.

Determinación de la actividad de fosfatasa alcalina

La actividad de fosfatasa alcalina se determinó con un kit de fosfatasa alcalina de Sigma-Aldrich (no. de cat. 85L2-1KT). Las monocapas de cultivos en placas de 24 pozos se fijaron con acetona al 60% en amortiguador de citrato durante 30 seg y luego se lavaron con agua destilada. Inmediatamente después 1 ml de solución alcalina de Naphthol AS-MX fosfato diluida en solución de sal de diazonio (1:24, v/v) se agregó a cada pozo y se incubó a 26°C durante 30 min sin luz. Las monocapas se lavaron con agua destilada durante 2 min. Los cultivos se observaron en un microscopio invertido Leica (Coldhams Lane, Cambridge, UK) y se tomaron micrografías. Para cuantificar la actividad de fosfatasa alcalina las monocapas se lavaron con PBS frío y se extrajeron con Triton X-100 al 1% en PBS frío. La concentración de proteína se cuantificó por el método de Bradford usando albúmina sérica bovina como estándar. La mezcla de reacción se preparó con 500 μ l de 0.1 M de 2-amino-2-metil propanol, 1 mM de $MgSO_4$, pH 10, 100 μ l de 10 mM de p-nitrofenil fosfato, 300 μ l de agua destilada y 100 μ l de extracto, y se incubó durante 45 min. Inmediatamente después, 2 ml de 0.04 N de NaOH se agregaron a cada tubo para detener la reacción. La absorbencia se midió a 405 nm y la actividad de fosfatasa alcalina se estimó mediante la fórmula:

$$Actividad = \frac{volumen\ (ml) \times (AbsTo - AbsTn)\ cm^{-1}}{\epsilon M_{405nm}\ p\text{-nitrofenol} \times Tiempo \times mg\ proteína}$$

en la que se consideró un coeficiente de extinción molar para el p-nitrofenol a 405 nm (ϵM_{405nm}) de 1.78×10^4 $M^{-1}cm^{-1}$.

Extracción de RNA total

El RNA total se extrajo mediante el método de isotiocianato de guanidina empleando Trizol (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA), se cuantificó espectrofotométricamente y se verificó su integridad por medio de electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y tinción con bromuro de etidio.

RT-PCR convencional y semicuantitativa

La transcripción reversa (RT) se realizó empleando 2 µg de RNA total en un volumen de reacción de 20 µl. La primera etapa de la reacción consistió en una incubación del RNA y 0.025 µg/µl de oligo dT₁₅ a 70°C durante 10 min, con el fin de permitir la unión del oligo dT₁₅ al RNA y deshacer las posibles estructuras secundarias. Todos los reactivos utilizados para la RT fueron de Promega (Madison, WI, USA) y el agua empleada se trató con dietilpirocarbonato (DEPC). A continuación se agregó amortiguador de la RT que tenía 50 mM de Tris-HCl, 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂, 10 mM de DTT, pH 8.3; además se agregaron 0.5 mM de dNTPs, 1.25 U/µl de RNasin (inhibidor de RNasas) y 10 U/µl de transcriptasa reversa del virus Moloney de la leucemia murina; la mezcla se mantuvo a 42°C durante 90 min. Finalmente, la mezcla se incubó a 70°C durante 5 min para inactivar la transcriptasa reversa. Los oligonucleótidos se diseñaron con base en secuencias de los mRNAs de ratón que se obtuvieron de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Los exones de estos mensajeros se localizaron al alinear las secuencias del mRNA con el DNA genómico en el programa BLAST (NCBI). Posteriormente, secuencias de oligonucleótidos complementarias tanto al final de un exon como al inicio del exon contiguo se seleccionaron con el programa EditSeq de DNASTar Lasergene (Madison, WI, USA). Esto con la finalidad de que se amplificara solamente el cDNA y no el DNA genómico en la PCR.

Los oligonucleótidos utilizados en la RT convencional (no semicuantitativa) para BMPR-IA fueron: sentido 5' CATTCTCATGTTCAAGGGCAG 3' y antisentido 5' GGCTTTCGGTGAATCCTTGC 3' con un producto de amplificación de 298 pb. Los oligonucleótidos empleados para BMPR-IB fueron: sentido 5'

GCATGAGAATATTCTGGGG 3' y antisentido 5' GTATTCTTCCACTATACCTCC 3' que generan un producto de 508 pb. Los oligonucleótidos para BMPR-II fueron: sentido 5' ACAACACCACTCAGTCCACC 3' y antisentido 5' TTGCACAGAGATCCATTGGG 3' que generan un producto de 461 pb. Los oligonucleótidos para Smad1 fueron: sentido 5' CCTTTTCAGATGCCAGCTG 3' y antisentido 5' AAAGGTGGACTCCTTTCCC 3' cuyo producto es de 367 pb. Finalmente, los oligonucleótidos para Smad5 fueron: sentido 5' GTGGAGAGTCCAGTCTTACC 3' y antisentido 5' GACAGGCTGAACATCTCTGC 3' con un producto de 399 pb. Los ciclos de PCR para BMPR-IA fueron 40, para BMPR-IB fueron 30 y para BMPR-II, Smad1 y Smad5 fueron 25.

Los oligonucleótidos utilizados para la RT semicuantitativa de GAPDH, que se expresa constitutivamente, fueron: sentido 5' TCACGGCAAATTC AACGGCA 3' y antisentido 5' TGTCATGGATGACCTTGGCC 3' que generan un producto de 343 pb. Los oligonucleótidos empleados para Runx2 fueron: sentido 5' AAAGCTTCTTTTGGGATCCG 3' y antisentido 5' AGGTGAAACTCTTGCCTCG 3' cuyo producto es de 573 pb. Los oligonucleótidos para fosfatasa alcalina fueron: sentido 5' TGGACTACCTCTTAGGTCTC 3' y antisentido 5' CTGGTAGTTGTTGTGAGCG 3' con un producto de 479 pb. Finalmente, los oligonucleótidos para osteocalcina fueron: sentido 5' TCTCTGACCTCACAGATGC 3' y antisentido 5' ATAGATGCGTTTGTAGGCGG 3' que generan un producto de 224 pb. Todos los oligonucleótidos fueron de Invitrogen, su estabilidad se evaluó con los programas EditSeq y PrimerSelect de DNASTar Lasergene y su alineamiento con el mRNA correspondiente se verificó con el programa BLAST Mouse del NCBI.

Las PCRs se realizaron en mezclas de reacción de 25 µl con 5 ng de cDNA, 200 µM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, 1 U/µl de Taq DNA polimerasa, 0.5 pmoles/µl de cada oligonucleótido y amortiguador B 1X (10 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, Triton X-100 al 0.1%, pH 9.0) en agua DEPC. Las condiciones para la PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial de 5 min a 94°C, 30 seg a 94°C, 30 seg a Ta y 1 min a 72°C a diferentes ciclos y extensión final de 5 min a 72°C. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en geles de

agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio. Las imágenes de los geles se obtuvieron con un foto-documentador ChemicDoc EQ de Bio-Rad (Hercules, CA, USA) y los pixeles de las bandas se cuantificaron con ayuda del programa Quantity One (Bio-Rad). Los niveles de RNA normalizados se expresaron como la razón de la intensidad de la señal en pixeles de cada gen con respecto a la señal del gen control (GAPDH) y se expresaron como porcentaje.

Cuantificación del grado de mineralización de la matriz extracelular

Las monocapas celulares se lavaron con PBS y se fijaron con formaldehído (JT Baker; Ecatepec, Estado de México, México) al 4% en PBS. Luego, se agregó a cada pozo 1 ml de 40 mM de rojo de alizarina (Sigma-Aldrich), pH 4.1, y se incubó a temperatura ambiente durante 20 min con agitación leve. El exceso de colorante se aspiró y las monocapas se lavaron con agua destilada. Para cuantificar la tinción, se agregaron a cada pozo 800 µl de ácido acético al 10% y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min con agitación. Las monocapas se recuperaron con un gendarme de hule, se llevaron a tubos Eppendorf y se mezclaron vigorosamente. Cada mezcla se cubrió con 500 µl de aceite mineral, se calentó a 85°C durante 10 min y se centrifugó a 20,000 g durante 15 min. Luego, 500 µl del sobrenadante se llevaron a un tubo nuevo y se agregaron 200 µl de hidróxido de amonio al 10% para neutralizar el ácido. La absorbencia se determinó a 405 nm (Gregory y cols, 2004).

Detección de proteoglicanos sulfatados y glicoproteínas carboxiladas

Las monocapas celulares previamente fijadas con formaldehído (JT Baker) al 4% en PBS se hidrataron con agua destilada. Luego, se agregó a cada pozo 1 ml de ácido acético al 3% y se incubó durante 3 min. Después de este tiempo, se agregó 1 ml de 7.6 mM de azul alciano (Sigma-Aldrich) y se incubó durante 30 min. Las monocapas se enjuagaron con agua destilada (Sheehan y Hrapchak, 1980).

Análisis estadístico

Los datos de la mayoría de los experimentos se expresaron como la media \pm la desviación estándar para cada grupo. Las diferencias significativas entre los grupos de tratamientos se evaluaron mediante análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de 0.05 (Microsoft Office Excel).

Los niveles de los transcritos se midieron en píxeles y se expresaron como la razón de la intensidad de cada gen con respecto a la intensidad de los transcritos del gen control GAPDH. Con la suma de los cocientes obtenidos del mismo tipo de tratamiento se calcularon las medias y las desviaciones estándar para cada tratamiento. La media y la desviación estándar de cada tratamiento se expresaron como porcentaje y se graficaron. El análisis estadístico de ANOVA permitió comparar los niveles de los transcritos en distintos tratamientos con un nivel de significancia de 0.05.

RESULTADOS

Los preadipocitos 3T3 expresan la vía de señalización de BMPs

Las BMPs promueven la osteogénesis de células mesenquimales activando una vía de señalización integrada por los receptores membranales BMPR-IA, BMPR-IB y BMPR-II, y por las proteínas citoplásmicas Smad1, Smad4 y Smad5 (Chen y cols, 2004). Aunque la expresión de esta vía ha sido previamente descrita en los preadipocitos F4 (Skillington y cols, 2002), ignoramos si los preadipocitos C4 la expresan también. Para determinar la capacidad de respuesta de los preadipocitos C4 a BMP -2, evaluamos por RT-PCR la expresión de los elementos de la vía de BMPs en estas células, así como en los preadipocitos F4. Como se muestra en la figura 5, ambas líneas celulares expresaron los mRNAs para BMPR-IA, BMPR-IB, BMPR-II, Smad1 y Smad5, tanto en el estado de preadipocito como en el de adipocito terminal. Cuando la diferenciación adiposa se inhibió con AR ninguna de las clonas expresó BMPR-IB, aunque si los demás elementos de la vía. Estos datos sugieren que tanto F4 como C4 pueden responder al estímulo de BMP-2, debido a que expresan los tres receptores membranales para esta proteína, así como las proteínas citoplásmicas que participan en la transducción de señales de BMPs.

Ni la BMP-2 ni la tricostatina A afectan la adipogénesis de 3T3, en tanto que la apicidina y el ácido valproico solo ejercen un efecto anti-adipogénico parcial

La BMP -2 ha mostrado capacidad osteo-inductora en varios sistemas de cultivo y en estudios preclínicos con animales (Chen y Mundy, 2004). Asimismo, se sabe que algunos iHDACs son capaces de bloquear la adipogénesis (Lagace y Nachtigal, 2004) y promover la osteogénesis de células mesenquimales (Cho y cols, 2005). Para evaluar los efectos de BMP-2 y de algunos iHDACs sobre la diferenciación de los preadipocitos 3T3, determinamos primeramente el efecto de diversas concentraciones de estos compuestos sobre la supervivencia de ambas clonas de preadipocitos. Los efectos de estos compuestos se ensayaron en

ausencia o presencia de 1 μM de AR, un probado inhibidor de la adipogénesis de las células 3T3. Mediante recuentos celulares directos encontramos que 3.8 nM de BMP-2 (figura 6A), 80 nM de apicidina (figura 6B), 1 mM de ácido valproico (figura 6C) y 5 nM de tricostatina A (figura 6D) no afectaron la supervivencia de ninguna de las clonas de preadipocitos, ni ejercieron efectos mitogénicos sobre éstas ($P < 0.05$). La inocuidad de las concentraciones señaladas fue independiente de la presencia del retinoide en el medio de cultivo. Por lo tanto, ensayamos los efectos de estos compuestos sobre la adipogénesis y la osteogénesis de 3T3 a las concentraciones señaladas.

Evaluamos los efectos de BMP -2 y de los tres iHDACs sobre la adipogénesis de los preadipocitos 3T3 cuantificando la acumulación intracitoplásmica de triglicéridos y la actividad de la enzima lipogénica G3PDH en estas células. Mediante tinción con rojo oleoso O encontramos que ambas clonas mostraron un alto grado de acumulación de lípidos luego de ocho días de post-confluencia en medio adipogénico. Dicha acumulación lipídica, referida aquí como 100%, fue totalmente bloqueada por el AR ($P < 0.05$) (figura 7A). Por el contrario, la adición de BMP -2 al medio adipogénico indujo incrementos moderados pero significativos en la acumulación lipídica de F4 (124%) y de C4 (133%) ($P < 0.05$). La capacidad adipogénica de la BMP -2 sobre éstas células se observó incluso en presencia de AR, pues F4 mostró 88% de acumulación lipídica, mientras que C4 mostró 102% ($P < 0.05$) cuando se les trató simultáneamente con ambos compuestos.

Por otro lado, la presencia de apicidina en el medio adipogénico disminuyó la acumulación lipídica de F4 en 67% y de C4 en 57% ($P < 0.05$) (figura 7B). La aplicación combinada de AR y apicidina disminuyó en 93% la acumulación de lípidos en ambas clonas de preadipocitos ($P < 0.05$). El ácido valproico, por su parte, disminuyó la acumulación lipídica en 39% en F4 y en 26% en C4 ($P < 0.05$) (figura 7C) y su combinación con AR disminuyó en 91% la acumulación lipídica en F4, mientras que en C4 la disminuyó en 87% ($P < 0.05$). Por último, la tricostatina A tuvo solo un efecto marginal sobre la acumulación lipídica, pues su efecto anti-adipogénico fue menor al 5% en ambas clonas ($P < 0.05$) (figura 7D). Finalmente, la

combinación de AR y tricostatina A disminuyó la adipogénesis en 93% en F4 y en 91% en C4 ($P<0.05$).

En condiciones osteogénicas ambas clonas de preadipocitos mostraron una fuerte reducción en su capacidad de acumulación de lípidos, de 91% en F4 y de 78% en C4 ($P<0.05$) (figura 8A). La aplicación separada de BMP -2 o AR al medio osteogénico no alteró este patrón de acumulación lipídica reducida, aunque, en el caso del retinoide, acentuó la disminución de la acumulación de lípidos en C4 (89% de inhibición) ($P<0.05$). La combinación de AR y BMP -2 disminuyó en 97% la adipogénesis de F4, mientras que en C4 la disminuyó en 89% ($P<0.05$). La adición de iHDACs al medio osteogénico tampoco afectó la disminución de la acumulación lipídica mostrada por los preadipocitos F4 y C4 (figuras 8B, 8C y 8D), salvo en el caso del ácido valproico que indujo un moderado pero significativo incremento en la acumulación de lípidos de F4, respecto al tratamiento con medio osteogénico solo (20.5% vs. 9%, respectivamente, $P<0.05$) (figura 8C).

Para confirmar los efectos de la BMP -2 y de los iHDACs sobre la diferenciación adiposa de los preadipocitos 3T3, ensayamos el efecto de estos compuestos sobre la actividad de la enzima G3PDH, otro marcador de la adipogénesis terminal. Ambas clonas de preadipocitos mostraron una alta actividad enzimática cuando se les mantuvo por ocho días de post-confluencia en medio adipogénico. En tales condiciones, la actividad de G3PDH fue sensiblemente mayor en F4 que en C4, como ha sido previamente reportado (Salazar-Olivo y cols, 1995) (figura 9A). La adición de AR al medio adipogénico redujo drásticamente la actividad de G3PDH en ambas clonas: 97% en F4 y 92% en C4 ($P<0.05$). Por el contrario, la adición de BMP -2 al medio adipogénico no tuvo efecto alguno sobre la actividad de G3PDH en ninguna de las dos líneas de preadipocitos ($P<0.05$). Interesantemente, la aplicación simultánea de AR y BMP-2 solamente redujo en 31% la actividad enzimática en F4, mientras que en C4 la redujo en 38% ($P<0.05$).

Los iHDACs bloquearon la actividad de G3PDH en diverso grado cuando se adicionaron al medio adipogénico. La apicidina mostró el mayor efecto inhibitorio al reducir la actividad de G3PDH en 68% para F4 y en 60% para C4 ($P<0.05$)

(figura 9B). El ácido valproico redujo la actividad de la enzima en 37% en F4 y en 17% en C4 ($P<0.05$) (figura 9C). Por el contrario, la tricostatina A no tuvo efecto sobre la actividad de G3PDH en ninguna de las clonas ($P<0.05$) (figura 9D). En todos los casos, la aplicación simultánea de cada uno de los iHDACs con AR indujo una inhibición de la actividad enzimática mayor (aproximadamente en 92% para ambas clonas), incluyendo la tricostatina A que no mostró efectos inhibitorios *per se* ($P<0.05$) (figuras 9B, 9C y 9D).

Por otra parte, en condiciones de cultivo osteogénicas, la actividad de G3PDH disminuyó marcadamente: 93% en F4 y 70% en C4, y la adición de AR acentuó la disminución hasta 99% en F4 y 94% en C4 ($P<0.05$). Ni BMP-2 ni cualquiera de los iHDACs ensayados alteraron la baja expresión de esta enzima lipogénica en ninguna de las dos clonas de preadipocitos ($P<0.05$) (figura 10).

El AR y la BMP-2, pero no los iHDACs, inducen la actividad de fosfatasa alcalina en preadipocitos 3T3 mantenidos en condiciones osteogénicas

La fosfatasa alcalina es una enzima involucrada en el metabolismo celular pre-óseo, pues participa indirectamente en la producción del fosfato de calcio necesario para la calcificación de la matriz extracelular. Debido a esto, se ha empleado como un marcador intermedio de osteogénesis (Stein y Lian, 1993). Para explorar el potencial osteogénico de los preadipocitos 3T3, analizamos la expresión de fosfatasa alcalina por estas células en condiciones adipogénicas y osteogénicas, así como el efecto del AR, la BMP-2 y los tres iHDACs sobre la actividad de esta enzima. En condiciones adipogénicas ambas clonas mostraron solo una actividad marginal de fosfatasa alcalina, la cual no fue modificada por el tratamiento con BMP-2, los iHDACs o el AR, ni por la aplicación conjunta de éste último y cualquiera de los compuestos restantes (figura 11).

En condiciones pro-osteogénicas la situación fue diferente. El medio osteogénico indujo una expresión mínima de fosfatasa alcalina en ambas clonas, la cual se incrementó con AR, BMP-2 y, más notoriamente, por el tratamiento combinado de ambos compuestos (figura 12A). Por el contrario, ninguno de los iHDACs indujo la expresión de fosfatasa alcalina (figuras 12B, 12C y 12D).

Interesantemente los iHDACs bloquearon la expresión de fosfatasa alcalina inducida por el AR (figuras 12B, 12C y 12D). Luego de 10 días de post-confluencia en condiciones osteogénicas, ambas clonas de preadipocitos mostraron niveles modestos de actividad de fosfatasa alcalina: 1.7×10^{-3} $\mu\text{moles}/\text{min}/\mu\text{g}$ en F4 y 1.5×10^{-3} $\mu\text{moles}/\text{min}/\mu\text{g}$ en C4 (figura 13). El AR incrementó 4 veces esta actividad en F4 y 2.2 veces en C4 ($P < 0.05$), en tanto que BMP-2 la incrementó aproximadamente 5 veces en ambas clonas ($P < 0.05$). Más aún, la combinación de AR con BMP-2 aumentó 8.3 veces la actividad de fosfatasa en F4, mientras que en C4 la aumentó 6.6 veces ($P < 0.05$).

Los preadipocitos 3T3 sobre-expresan genes del linaje osteocítico en respuesta a AR y BMP-2

Para caracterizar con mayor detalle el potencial osteogénico de los preadipocitos 3T3, analizamos mediante RT-PCR semicuantitativa la expresión en estas células de los genes Runx2, fosfatasa alcalina y osteocalcina que se expresan durante la osteogénesis. Este método se basa en la amplificación simultánea de los cDNAs derivados de los transcritos de los genes problema y de un gen control, y requiere que la amplificación no alcance la saturación. Por ello, determinar la fase exponencial de la reacción de amplificación es el paso crítico de la técnica. Las cinéticas de amplificación de los transcritos se determinaron usando RNA total de cultivos preconfluentes de preadipocitos F4 y C4, o cultivos de éstas células mantenidas por 10 días de post-confluencia en medio osteogénico. Como control positivo se utilizó el mRNA de los preadipocitos F4 cultivados en medio osteogénico.

La figura 14 muestra las cinéticas de amplificación para los transcritos de los tres genes marcadores de osteogénesis y para el gen de GAPDH usado como control. Al lado de cada cinética se muestran imágenes representativas de la electroforesis de los productos de amplificación a lo largo de ciclos de reacción sucesivos. La fase exponencial para Runx2 en la preconfluencia se observó entre los ciclos 24 y 32 en F4 y entre los ciclos 22 y 30 en C4. En medio osteogénico la fase exponencial de este gen se observó entre los ciclos 24 y 28 en F4 y entre los

ciclos 24 y 30 en C4. La amplificación del cDNA de fosfatasa alcalina tanto en la preconfluencia como en medio osteogénico fue exponencial entre los ciclos 24 y 30 en ambas clonas. Por su parte, la amplificación del cDNA de osteocalcina en la preconfluencia se observó entre los ciclos 22 y 28 en ambas clonas, mientras que en medio osteogénico se observó entre los ciclos 20 y 26. Por último, la fase exponencial para GAPDH tanto en la preconfluencia como en medio osteogénico se observó entre los ciclos 20 y 26 para ambas clonas. Por lo tanto, el número de ciclos de amplificación empleado en los análisis de expresión de los marcadores de osteogénesis fue 26 para Runx2, 25 para fosfatasa alcalina y 22 para osteocalcina. En el caso de GAPDH, la PCR abarcó 22 ciclos.

Bajo las condiciones señaladas analizamos la expresión de los tres marcadores de osteogénesis en cultivos preconfluentes de 3T3, así como en condiciones permisivas para la osteogénesis. En preconfluencia ambas clonas mostraron un nivel de expresión basal (referido como 1) para Runx2, un marcador temprano de la osteogénesis, el cual se incrementó 4.8 veces en F4 y en C4 luego de 10 días de post-confluencia en medio osteogénico ($P<0.05$) (figura 15). El AR indujo incrementos adicionales en la expresión de Runx2 de 8.4 veces en F4 y 7.3 veces en C4 ($P<0.05$). Por su parte, la BMP-2 incrementó la expresión de Runx2 9.4 veces en F4 y 9 veces en C4 ($P<0.05$). Por último, la combinación de AR y BMP-2 indujo un incremento máximo en la expresión de Runx2 de 14 veces en F4 y 12.4 veces en C4 ($P<0.05$).

Analizamos también la expresión del gen de la fosfatasa alcalina, un marcador de etapas intermedias de osteogénesis. Los niveles basales de expresión de fosfatasa alcalina mostrados por los cultivo preconfluentes de ambas clonas se incrementaron 2.1 veces en F4 y 2.6 veces en C4 luego del tratamiento con medio osteogénico ($P<0.05$) (figura 15). Asimismo, el AR incrementó la expresión de fosfatasa alcalina 5.7 veces en F4 y 6.9 veces en C4 ($P<0.05$). Por su parte, la BMP-2 incrementó la expresión de fosfatasa 7.5 veces en F4 y 8.8 veces en C4 ($P<0.05$). Finalmente, similar a lo ocurrido con Runx2, la combinación de BMP-2 y AR indujo un incremento máximo en la expresión de fosfatasa alcalina de 10 veces en F4 y 10.7 veces en C4 ($P<0.05$).

El patrón de expresión de la osteocalcina, un marcador tardío de osteogénesis, por los preadipocitos 3T3 fue esencialmente similar al de los dos genes anteriores. Los niveles basales de expresión de osteocalcina en los cultivos preconfluentes de ambas clonas se incrementaron 4.8 veces en F4 y 4.5 veces en C4 luego del tratamiento con medio osteogénico ($P<0.05$) (figura 15). El AR incrementó la expresión de osteocalcina 9.7 veces en F4 y 8.6 veces en C4 ($P<0.05$). Por su parte, la BMP-2 incrementó la expresión de osteocalcina 10.8 veces en F4 y 9.8 veces en C4 ($P<0.05$). Por último, la combinación de AR y BMP-2 indujo un incremento máximo en la expresión de osteocalcina de 17.5 veces en F4 y 16 veces en C4 ($P<0.05$).

El AR y la BMP-2 inducen la mineralización de la matriz extracelular de los preadipocitos 3T3 pero no la acumulación de proteoglicanos sulfatados y glicoproteínas carboxiladas

La mineralización de la matriz extracelular es una manifestación fenotípica tardía de la diferenciación osteoblástica. La sobre-expresión de marcadores osteoblásticos por los preadipocitos 3T3 nos llevó a cuantificar el grado de mineralización de la matriz extracelular de estas células por tinción con rojo de alizarina S, un método que permite cuantificar los depósitos de calcio en cultivos celulares (Gregory y cols, 2004). La figura 16 muestra por medio de micrografías de los cultivos y datos cuantitativos, que en medio osteogénico tanto F4 como C4 mostraron un nivel basal de mineralización de la matriz extracelular. El AR incrementó la mineralización 1.6 veces en F4 y 1.5 veces en C4 ($P<0.05$) en tanto que la BMP-2 incrementó este rasgo 2.1 veces en F4 y 2 veces en C4 ($P<0.05$). Finalmente, la combinación de BMP-2 y AR incrementó el grado de mineralización a un máximo de 2.8 veces en F4 y 2.7 veces en C4 ($P<0.05$).

Debido a que en la osificación endocondral el tejido óseo se forma a partir de un intermediario cartilaginoso (Shum y Nuckolls, 2002), evaluamos también si las condiciones que utilizamos para transdiferenciar preadipocitos en osteocitos podrían inducir marcadores de condrogénesis. La figura 17 muestra, en micrografías de cultivos teñidos con azul alciano, que el medio osteo-inductor, solo

o en combinación con AR, no indujo la presencia de proteoglicanos sulfatados y glicoproteínas carboxiladas. Asimismo, la BMP -2 sola o en combinación con AR indujo solamente una acumulación marginal de estos componentes de matriz extracelular.

DISCUSIÓN

La comprensión detallada de los mecanismos que regulan la diferenciación de las MSCs adultas es crítica para explicar su desarrollo en distintos linajes y para el diseño de estrategias terapéuticas de padecimientos derivados de alteraciones en el control de su diferenciación. La disminución en la masa ósea que caracteriza a la osteoporosis se produce a la par de un incremento en la adipogénesis (Meunier y cols, 1971). Esto sugiere que los nuevos adipocitos se generan en detrimento de los osteocitos a partir de un precursor mesenquimal común. En este sentido, es importante determinar hasta qué punto células que han iniciado la diferenciación en un linaje mesenquimal pueden transdiferenciarse en otro.

Diversos compuestos son capaces de inducir la osteogénesis o inhibir la adipogénesis en células mesenquimales. El AR, un inhibidor de la diferenciación adiposa de preadipocitos F4 (Kuri-Harcuch, 1982, Salazar-Olivo y cols, 1994) promueve la osteogénesis terminal de osteoblastos primarios (Song y cols, 2005). Por otra parte, la BMP-2, un inductor de diferenciación mesenquimal, promueve la expresión de marcadores osteogénicos y adipogénicos en preadipocitos F4 (Ji y cols, 2000) y colabora con el AR para inducir la osteogénesis en estas células (Skillington y cols, 2002). Así también, se ha determinado recientemente que iHDACs bloquean la adipogénesis de preadipocitos 3T3 (Lagace y Nachtigal, 2004) y, por otra parte, inducen la osteogénesis de células estromales humanas (Cho y cols, 2005).

En el presente trabajo evaluamos la capacidad osteogénica de dos líneas de preadipocitos, 3T3-F442A y 3T3-F442A/C4, en respuesta a compuestos que inhiben la adipogénesis y que inducen la osteogénesis. Mediante análisis de RT-PCR encontramos que ambas clonas expresan la vía de señalización de BMP -2 tanto en el estado de preadipocito como en el de adipocito terminal (figura 5), lo que corrobora resultados previos en F4 (Skillington y cols, 2002) y sugiere que los preadipocitos C4 pueden responder al estímulo de BMP -2. Nuestros resultados mostraron también que la adición de AR al medio adipogénico bloqueó la

transcripción de BMPR-IB en ambas líneas celulares. Este efecto, hasta ahora no descrito, resulta contradictorio con los efectos osteo-inductores de AR (Song y cols, 2005) y la probada participación de BMPR-IB en la osteogénesis (Chen y cols, 1998, Wan y cols, 2006). Dado que la expresión de este receptor es modulable por la presencia de factores de crecimiento (Chen y cols, 1998, Wan y cols, 2006), una posible explicación a nuestro resultado sería que la insulina, presente en el medio adipogénico pero no en el osteogénico, afectó negativamente la expresión de BMPR-IB. También es posible que la BMP -2 al estimular el nivel de proteína de BMPR-IB (Wan y cols, 2006) contrarreste el efecto bloqueador del AR sobre la expresión de este receptor.

Una vez que determinamos que C4, al igual que F4, expresa la vía de señalización de BMPs, evaluamos el impacto de BMP-2, del AR y de los iHDACs apicidina, ácido valproico y tricostatina A en la adipogénesis de ambas clonas, a concentraciones que no afectan su supervivencia (figura 6). Nuestros resultados muestran que en condiciones adipogénicas, BMP-2 incrementó moderadamente la adipogénesis en ambas clonas, lo que corrobora resultados previos que muestran que BMP-2 induce la diferenciación adiposa de células multipotentes (Ahrens y cols, 1993, Zehentner y cols, 2000). Interesantemente, encontramos que BMP -2 revirtió el efecto anti-adipogénico del AR en ambas clonas, una actividad hasta ahora no descrita para esta proteína (figuras 7A y 9A), y para la cual no tenemos actualmente una explicación de su mecanismo. No obstante, dado que el AR bloquea la adipogénesis de 3T3-L1 al inhibir la transcripción de PPAR γ y C/EBP α mediada por C/EBP β (Schwarz y cols, 1997), podemos especular que la BMP -2 podría salvar el efecto anti-adipogénico del AR inhibiendo su efecto sobre genes modulados por C/EBP β , o bien, actuando a través de alguna ruta paralela.

Por otra parte, encontramos que la tricostatina A no afecta la acumulación lipídica ni la actividad de G3PDH de ninguna de las clonas estudiadas (figuras 7D y 9D), desafiando evidencia previa de que este compuesto disminuye la acumulación lipídica de 3T3-L1 en un 50% (Lagace y cols, 2004). Mas aún, debido a que todas las HDACs son igualmente susceptibles a la acción de tricostatina A (de Ruijter y cols, 2003), nuestros resultados también contradicen que este

compuesto sea uno de los iHDACs más potentes (Vavrova y cols, 2005). La discrepancia entre nuestro resultado y el previo (Lagace y cols, 2004) puede deberse a diferencias en el status de desarrollo entre 3T3-L1 y F4 (Gregoire y cols, 1998). Experimentos adicionales en torno a los efectos de la tricostatina A sobre estas líneas de preadipocitos nos permitirán una visión más detallada de los mecanismos por los que la remodelación de la cromatina afecta la adipogénesis. Por el contrario, el ácido valproico ejerce un efecto anti-adipogénico parcial sobre C4 y F4 (figuras 7C y 9C), lo cual concuerda con lo observado en 3T3-L1 (Lagace y cols, 2004). Nuestros resultados mostraron también que la apicidina inhibió la adipogénesis de los preadipocitos 3T3 (figuras 7B y 9B), lo cual es el primer reporte de un efecto anti-adipogénico de este iHDAC. La capacidad anti-adipogénica de apicidina fue mayor que la de los iHDACs restantes. Por otra parte, en condiciones osteogénicas ninguna de las dos clonas mostró un grado apreciable de ninguno de los dos marcadores de adipogénesis, aún en presencia de BMP-2 o de cualquiera de los iHDACs (figuras 8 y 10).

Para explorar el potencial osteogénico de los preadipocitos 3T3 analizamos su expresión de fosfatasa alcalina. En condiciones adipogénicas, ambas clonas mostraron una actividad marginal de fosfatasa alcalina, la cual no se modificó por el tratamiento con BMP-2, los iHDACs o el AR, así como tampoco por la aplicación conjunta de éste último y BMP-2 o los iHDACs (figura 11). Por el contrario, en condiciones osteogénicas, el AR y la BMP-2, pero no los iHDACs, indujeron la actividad de fosfatasa alcalina en los preadipocitos 3T3 (figura 12). Esto último difiere de la evidencia de que el ácido valproico incrementa la transcripción de fosfatasa alcalina en células estromales humanas cultivadas en condiciones similares a las de nuestro medio osteo-inductor (Cho y cols, 2005). No obstante, podríamos suponer que en los ocho días que mantuvimos a las células en medio osteo-inductor el ácido valproico incrementaría los niveles del mRNA de fosfatasa alcalina pero no necesariamente su nivel de proteína o su actividad. De acuerdo con los resultados anteriores, el medio osteogénico adicionado con AR y BMP-2 redujo marcadamente la adipogénesis e indujo en gran medida la expresión de

fosfatasa alcalina. De esta forma, logramos obtener las condiciones para evaluar la transdiferenciación a osteocitos de los preadipocitos F4 y C4.

Posteriormente, determinamos que en condiciones osteogénicas el AR y BMP-2 cooperan para inducir la actividad de fosfatasa alcalina, un marcador intermedio de osteogénesis, en preadipocitos 3T3 (figura 13), lo que apoya resultados previos en F4 (Skillington y cols, 2002). Cabe resaltar que en presencia de AR, BMP-2 o su combinación, la actividad de fosfatasa fue mayor en los preadipocitos F4 que en C4.

Para estudiar más detalladamente el potencial osteogénico de los preadipocitos 3T3, determinamos los niveles de los transcritos de Runx2, fosfatasa alcalina y osteocalcina, que son marcadores de osteogénesis temprana, intermedia y tardía, respectivamente. Con base en los análisis de expresión, y similar a lo ocurrido con la actividad de fosfatasa alcalina, es claro que el AR y BMP-2 inducen conjuntamente la sobre-expresión de Runx2, fosfatasa alcalina y osteocalcina en F4 y C4 (figura 15), la cual para el caso de Runx2 y fosfatasa alcalina fue mayor en F4. En conjunto, los resultados presentados hasta el momento, contrastan con nuestra idea inicial de que la clona C4 posee una mayor capacidad osteogénica que F4, debido a sus características morfológicas similares a osteoblastos.

Los efectos aditivos del AR y la BMP-2 sobre la diferenciación osteogénica de los preadipocitos 3T3 podrían resultar en parte de la capacidad del AR para inhibir la fuerte tendencia adipogénica de estas células, la que a su vez prevendría su potencial osteogénico. En efecto, factores no identificados secretados por los adipocitos inhiben la diferenciación osteoblástica (Maurin y cols, 2000), y la inhibición de la diferenciación adiposa por el AR podría bloquear esos inhibidores. Sin embargo, nuestros resultados indican que la capacidad del AR para promover la diferenciación osteoblástica inducida por BMP-2 va más allá de un mero efecto anti-adipogénico, debido a que estos dos compuestos colaboran para inducir la expresión de marcadores génicos y bioquímicos de osteogénesis. Debido a que el AR puede incrementar la expresión de BMP-2 (Holvering y cols, 2000), tal cooperación podría resultar de la inducción de BMP-2 por el AR, o bien, de la

cooperación directa de elementos de la vía de señalización de ambos compuestos. Por ejemplo, el receptor de AR podría interactuar directamente con Smads activadas por BMP-2 para reprimir o activar la transcripción de genes involucrados en la diferenciación adipocítica u osteocítica, respectivamente. Otra posibilidad es que AR y BMP -2 cooperen en la transdiferenciación osteocítica, debido a que ambos compuestos inducen la expresión de fosfatasa alcalina: BMP-2 a través de Smad5 y AR a través de Ets1 (*v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1*) (Qi y cols, 2003).

Finalmente, debido a que en las condiciones que determinamos para la transdiferenciación ambas clonas de preadipocitos 3T3 expresan marcadores osteogénicos tempranos e intermedios, nos interesó determinar si estas células expresaban el fenotipo terminal de osteocitos, que está dado por la mineralización de la matriz. Encontramos que el AR y la BMP -2 inducen por separado y conjuntamente la mineralización de la matriz extracelular de F4 y C4 (figura 16), lo cual está de acuerdo con un trabajo previo donde se muestra que F4 mineraliza su matriz extracelular en respuesta a AR y BMP-2 (Skillington y cols, 2002).

Debido a que en la osificación endocondral, el tejido óseo se forma a partir de un intermediario cartilaginoso (Shum y Nuckolls, 2002), nos preguntamos si las condiciones que utilizamos para transdiferenciar preadipocitos en osteocitos podrían inducir también la transdiferenciación condrocítica. No obstante, en medio osteogénico, la aplicación por separado o conjunta de AR y BMP -2 durante 10 días no induce la acumulación de proteoglicanos sulfatados y glicoproteínas carboxiladas, un fenotipo tardío del linaje condrogénico (figura 17). Esto no quiere decir que ambas clonas de preadipocitos carezcan del potencial para transdiferenciarse en condrocitos, sino simplemente que nuestras condiciones para la transdiferenciación osteocítica no contienen las señales adecuadas para la condrogénesis. Otra alternativa podría ser que, al momento de evaluar el fenotipo condrogénico, células parecidas a condrocitos ya hubieran sido reemplazadas por células similares a osteocitos, en este sentido, valdría la pena evaluar las características condrogénicas en tiempos más cortos.

La expresión de marcadores osteogénicos por los preadipocitos 3T3 puede ser el resultado de un proceso de transdiferenciación, como se ha propuesto previamente (Skillington y cols, 2002). Este concepto implica que una célula que ha iniciado la reprogramación génica necesaria para un linaje celular determinado, cambie su programa genético para dirigirse a un linaje diferente. No obstante, una explicación alternativa sería que estas poblaciones celulares, así como las de los tejidos adiposos *in vivo*, contengan en todo momento células multi-potentes capaces de desarrollar patrones de diferenciación alternativos en respuesta a señales específicas. Datos previos apuntan a que la primera posibilidad es la más probable, debido a que la adiposina, un marcador tardío de la adipogénesis, abate su expresión en presencia de BMP-2 y AR (Skillington y cols, 2002; Wan y cols, 2006). Sin embargo, es necesario el análisis de expresión de muchos más marcadores adipogénicos en respuesta a BMP-2 y AR para concluir que en los preadipocitos se está llevando a cabo una reprogramación génica en respuesta a estos compuestos.

En general, nuestros resultados establecen que el compromiso hacia la diferenciación osteocítica de dos líneas de preadipocitos muy relacionadas está dado separadamente por el AR y la BMP-2, y ocurre con una disminución en su capacidad para diferenciarse en adipocitos. Además, determinamos que estos compuestos, en nuestras condiciones y días de cultivo, son señales mejores para la diferenciación osteocítica de 3T3 por encima de los iHDACs ensayados. Asimismo, encontramos que las señales del medio osteo-inductor, el AR y la BMP-2 promueven conjuntamente la transdiferenciación de los preadipocitos F4 y C4 en células parecidas a osteocitos al inducir la expresión de marcadores génicos o bioquímicos de este linaje, lo cual no implica que éstas células sean osteocitos fidedignos funcionales. Finalmente, determinamos que C4 no representa un mejor modelo para estudiar la transdiferenciación osteocítica de preadipocitos, debido a que expresa en un grado similar a F4 la mayoría de los marcadores de osteogénesis evaluados en este trabajo.

REFERENCIAS

- Abderrahim-Ferkoune A, Bezy O, Astri-Roques S, Elabd C, Ailhaud G, Amri EZ (2004) *Transdifferentiation of preadipose cells into smooth muscle-like cells: role of aortic carboxypeptidase-like protein*. Exp Cell Res 293:219-228
- Aguila HL, Rowe DW (2005) *Skeletal development, bone remodeling, and hematopoiesis*. Immunol Rev 208:7-18
- Ahrens M, Ankenbauer T, Schroder D, Hollnagel A, Mayer H, Gross G (1993) *Expression of human bone morphogenetic proteins-2 or -4 in murine mesenchymal progenitor C3H10T1/2 cells induces differentiation into distinct mesenchymal cell lineages*. DNA Cell Biol 12:871-880
- Bowers RR, Kim JW, Otto TC, Lane MD (2006) *Stable stem cell commitment to the adipocyte lineage by inhibition of DNA methylation: role of the BMP-4 gene*. Proc Natl Acad Sci U S A 103:13022-13027
- Chen D, Harris MA, Rossini G, Dunstan CR, Dallas SL, Feng JQ, Mundy GR, Harris SE (1997) *Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) enhances BMP-3, BMP-4, and bone cell differentiation marker gene expression during the induction of mineralized bone matrix formation in cultures of fetal rat calvarial osteoblasts*. Calcif Tissue Int 60:283-290
- Chen D, Ji X, Harris MA, Feng JQ, Karsenty G, Celeste AJ, Rosen V, Mundy GR, Harris SE (1998) *Differential roles for bone morphogenetic protein (BMP) receptor type IB and IA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages*. J Cell Biol 142:295-305
- Chen D, Zhao M, Mundy GR (2004) *Bone morphogenetic proteins*. Growth Factors 22:233-241
- Cho HH, Park HT, Kim YJ, Bae YC, Suh KT, Jung JS (2005) *Induction of osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by histone deacetylase inhibitors*. J Cell Biochem 96:533-542
- Cinti S (2002) *Adipocyte differentiation and transdifferentiation: plasticity of the adipose organ*. J Endocrinol Invest 25:823-835

- de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB (2003) *Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family*. *Biochem J* 370:737-749
- Fujii M, Takeda K, Imamura T, Aoki H, Sampath TK, Enomoto S, Kawabata M, Kato M, Ichijo H, Miyazono K (1999) *Roles of bone morphogenetic protein type I receptors and Smad proteins in osteoblast and chondroblast differentiation*. *Mol Biol Cell* 10:3801-3813
- Green H, Kehinde O (1976) *Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells*. *Cell* 7:105-113
- Gregoire FM, Smas CM, Sul HS (1998) *Understanding adipocyte differentiation*. *Physiol Rev* 78:783-809
- Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ (2004) *An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction*. *Anal Biochem* 329:77-84
- Harris SE, Sabatini M, Harris MA, Feng JQ, Wozney J, Mundy GR (1994) *Expression of bone morphogenetic protein messenger RNA in prolonged cultures of fetal rat calvarial cells*. *J Bone Miner Res* 9:389-394
- Helvering LM, Sharp RL, Ou X, Geiser AG (2000) *Regulation of the promoters for the human bone morphogenetic protein 2 and 4 genes*. *Gene* 256:123-138
- Ji X, Chen D, Xu C, Harris SE, Mundy GR, Yoneda T (2000) *Patterns of gene expression associated with BMP-2-induced osteoblast and adipocyte differentiation of mesenchymal progenitor cell 3T3-F442A*. *J Bone Miner Metab* 18:132-139
- Kuri-Harcuch W, Green H (1978) *Adipose conversion of 3T3 cells depends on a serum factor*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:6107-6109
- Kuri-Harcuch W (1982) *Differentiation of 3T3-F442A cells into adipocytes is inhibited by retinoic acid*. *Differentiation* 23:164-169
- Lagace DC, Nachtigal MW (2004) *Inhibition of histone deacetylase activity by valproic acid blocks adipogenesis*. *J Biol Chem* 279:18851-18860

- Maurin AC, Chavassieux PM, Frappart L, Delmas PD, Serre CM, Meunier PJ (2000) *Influence of mature adipocytes on osteoblast proliferation in human primary cocultures*. Bone 26:485-489
- Meunier P, Aaron J, Edouard C, Vignon G (1971) *Osteoporosis and the replacement of cell populations of the marrow by adipose tissue. A quantitative study of 84 iliac bone biopsies*. Clin Orthop Relat Res 80:147-154
- Pei L, Tontonoz P (2004) *Fat's loss is bone's gain*. J Clin Invest 113:805-806
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science 284:143-147
- Prockop DJ (1997) *Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues*. Science 276:71-74
- Qi H, Aguiar DJ, Williams SM, La Pean A, Pan W, Verfaillie CM (2003) *Identification of genes responsible for osteoblast differentiation from human mesodermal progenitor cells*. Proc Natl Acad Sci U S A 100:3305-3310
- Ramirez-Zacarias JL, Castro-Munozledo F, Kuri-Harcuch W (1992) *Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O*. Histochemistry 97:493-497
- Salazar-Olivo LA, Castro-Munozledo F, de la Garza M, Kuri-Harcuch W (1994) *Inhibition of 3T3 adipogenesis by retinoic acid is not mediated by cytoplasmic retinoic acid-binding protein*. Biochem Biophys Res Commun 204:257-263
- Salazar-Olivo LA, Castro-Munozledo F, Kuri-Harcuch W (1995) *A preadipose 3T3 cell variant highly sensitive to adipogenic factors and to human growth hormone*. J Cell Sci 108:2101-2107
- Schwarz EJ, Reginato MJ, Shao D, Krakow SL, Lazar MA (1997) *Retinoic acid blocks adipogenesis by inhibiting C/EBPbeta-mediated transcription*. Mol Cell Biol 17:1552-1561
- Sheehan D, Hrapchak B (1980) *Theory and practice of Histotechnology, 2nd Ed*. Battelle Press, Ohio 163,173-174

- Shum L, Nuckolls G (2002) *The life cycle of chondrocytes in the developing skeleton*. Arthritis Res 4:94-106
- Skillington J, Choy L, Derynck R (2002) *Bone morphogenetic protein and retinoic acid signaling cooperate to induce osteoblast differentiation of preadipocytes*. J Cell Biol 159:135-146
- Sommarin Y, Heinegard D (1983) *Specific interaction between cartilage proteoglycans and hyaluronic acid at the chondrocyte cell surface* Biochem J 214:777-784
- Song HM, Nacamuli RP, Xia W, Bari AS, Shi YY, Fang TD, Longaker MT (2005) *High-dose retinoic acid modulates rat calvarial osteoblast biology*. J Cell Physiol 202:255-262
- Stein GS, Lian JB (1993) *Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype*. Endocr Rev 14:424-442
- Todaro GJ, Green H (1963) *Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines*. J Cell Biol 17:299-313
- Vavrova J, Rezacova M, Osterreicher J. (2005) *Inhibitors of histone-deacetylase*. J. Appl. Biomed 3:115–121
- Wan DC, Shi YY, Nacamuli RP, Quarto N, Lyons KM, Longaker MT (2006) *Osteogenic differentiation of mouse adipose-derived adult stromal cells requires retinoic acid and bone morphogenetic protein receptor type IB signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A 103:12335-12340
- Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA (1988) *Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities*. Science 242:1528-1534
- Yamaguchi A, Komori T, Suda T (2000) *Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1*. Endocr Rev 21:393-411

Zehentner BK, Leser U, Burtscher H (2000) *BMP-2 and sonic hedgehog have contrary effects on adipocyte-like differentiation of C3H10T1/2 cells*. DNA Cell Biol 19:275-281

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH (2002) *Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells*. Mol Biol Cell 13:4279-4295

PIES DE FIGURAS

Figura 1. Diferenciación adiposa. Los preadipocitos proliferan hasta la confluencia y en este punto detienen su crecimiento. Los preadipocitos quiescentes son estimulados por una combinación de factores adipogénicos que los compromete a convertirse en adipocitos y expandirse clonalmente. Finalmente, estos preadipocitos comprometidos cambian drásticamente su forma alargada en esférica y comienzan a acumular lípidos en su citoplasma, hasta alcanzar la diferenciación terminal en adipocitos.

Figura 2. Eventos transcripcionales de la diferenciación adiposa. *In vitro*, la exposición de los preadipocitos confluentes a factores adipogénicos induce la expresión de C/EBP β y C/EBP δ , los que a su vez activan la expresión de PPAR γ y C/EBP α . La producción de 15-desoxi-delta 12, 14-prostaglandina J2, un ligando de PPAR γ , es un paso limitante en esta cascada transcripcional. Durante la fase terminal de diferenciación adiposa, la activación de la cascada transcripcional conduce a un incremento en los niveles de mRNA y proteína de varias enzimas que participan en la síntesis de triacilglicerol.

Figura 3. Diferenciación osteogénica. Durante la fase inicial de la osteogénesis *in vitro* las MSCs proliferan hasta alcanzar confluencia y luego se comprometen para convertirse en preosteoblastos. Luego, estas células precursoras de osteoblastos proliferan de forma clonal y cambian su morfología fusiforme en poliédrica. Después de esta etapa, las células detienen su crecimiento y comienzan a producir fosfatasa alcalina, que participa en la producción del fosfato de calcio necesario para la mineralización de la matriz extracelular. Finalmente, las células adquieren una morfología con proyecciones periféricas y secretan proteínas componentes de la matriz extracelular ósea.

Figura 4. La vía de señalización de BMP-2. La BMP-2 se une a los BMPRs, lo cual permite que BMPR-II se una a BMPR-I. Una vez que estos receptores están

en contacto cercano, BMPR-II activa mediante fosforilación de residuos de serina o treonina a BMPR-I. Después, BMPR-I activado fosforila a las proteínas citoplásmicas Smad1 y Smad5, que se activan y forman un complejo con Smad4 para finalmente ser translocadas al núcleo, donde interactúan con factores de transcripción osteo-inductores (Chen y cols, 1998, Fujii y cols, 1999).

Figura 5. Expresión de la vía de señalización de BMP-2 en preadipocitos 3T3.

El RNA total de cultivos preconfluentes (PC) o de cultivos mantenidos por ocho días de post-confluencia en medio adipogénico (MA) o medio adipogénico adicionado con 1 μ M de ácido retinoico (MA+AR) se extrajo con Trizol[®]. Los cDNAs se generaron mediante transcripción reversa (RT) y se amplificaron por PCR. –RT, controles sin transcriptasa reversa.

Figura 6. Efecto de BMP-2 e iHDACs sobre la supervivencia de preadipocitos 3T3.

Preadipocitos F4 (símbolos negros) y C4 (símbolos blancos) se inocularon en medio basal (MB; ●, ○). Después de 48 horas, los cultivos se alimentaron con MB, MB con 1 μ M de ácido retinoico (MB+AR; ▼, ▽), MB con 3.8 nM de BMP -2 sola (MB+BMP -2; ■, □) o con AR (MB+AR+BMP-2; ◆, ◇), MB con 80 nM de apicidina sola (MB+AP; ■, □) o con AR (MB+AR+AP; ◆, ◇), MB con 1 mM de ácido valproico solo (MB+VPA; ■, □) o con AR (MB+AR+VPA; ◆, ◇) y MB con 5 nM de tricostatina A sola (MB+TSA; ■, □) o con AR (MB+AR+TSA; ◆, ◇). En los días señalados se determinó el número de células por tratamiento mediante recuentos celulares directos por duplicado.

Figura 7. Efecto de BMP-2 e iHDACs sobre la acumulación lipídica de preadipocitos 3T3 mantenidos en medio adipogénico.

Cultivos de preadipocitos 3T3 se incubaron por ocho días de post-confluencia con medio adipogénico (MA), MA con 1 μ M de ácido retinoico (MA+AR), MA con 3.8 nM de BMP-2 sola (MA+BMP-2) o con AR (MA+AR+BMP -2), MA con 80 nM de apicidina sola (MA+AP) o con AR (MA+AR+AP), MA con 1 mM de ácido valproico solo (MA+VPA) o con AR (MA+AR+VPA) y MA con 5 nM de tricostatina A sola

(MA+TSA) o con AR (MA+AR+TSA). Al cabo, los cultivos se fijaron con formaldehído al 4% y se tiñeron con rojo oleoso O. El colorante retenido en las monocapas celulares se extrajo con isopropanol y se cuantificó espectrofotométricamente a 510 nm.

Figura 8. Efecto de BMP-2 e iHDACs sobre la acumulación lipídica de preadipocitos 3T3 mantenidos en medio osteogénico. Cultivos de preadipocitos 3T3 se incubaron por ocho días de post-confluencia con medio osteogénico (MO), MO con 1 μ M de ácido retinoico (MO+AR), MO con 3.8 nM de BMP-2 sola (MO+BMP-2) o con ácido AR (MO+AR+BMP-2), MO con 80 nM de apicidina sola (MO+AP) o con AR (MO+AR+AP), MO con 1 mM de ácido valproico solo (MO+VPA) o con AR (MO+AR+VPA) y MO con 5 nM de tricostatina A sola (MO+TSA) o con AR (MO+AR+TSA). Al cabo, los cultivos se fijaron con formaldehído al 4% y se tiñeron con rojo oleoso O. El colorante retenido en las monocapas celulares se extrajo con isopropanol y se cuantificó espectrofotométricamente a 510 nm.

Figura 9. Efecto de BMP-2 e iHDACs sobre la actividad de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) de preadipocitos 3T3 mantenidos en medio adipogénico. Cultivos de preadipocitos 3T3 se mantuvieron por ocho días de post-confluencia en medio adipogénico (MA), MA con 1 μ M de ácido retinoico (MA+AR), MA con 3.8 nM de BMP-2 sola (MA+BMP-2) o con AR (MA+AR+BMP-2), MA con 80 nM de apicidina sola (MA+AP) o con AR (MA+AR+AP), MA con 1 mM de ácido valproico solo (MA+VPA) o con AR (MA+AR+VPA) y MA con 5 nM de tricostatina A sola (MA+TSA) o con AR (MA+AR+TSA). Al cabo, se hicieron extractos citosólicos de los cultivos. Para determinar la actividad de G3PDH, se mezclaron estos extractos con dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y se incubó el tiempo correspondiente al grado de diferenciación adiposa. Finalmente, la reacción se detuvo con SDS al 20% y se determinó su absorbencia a 340 nm.

Figura 10. Efecto de BMP-2 e iHDACs sobre la actividad de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) de preadipocitos 3T3 mantenidos en medio osteogénico. Cultivos de preadipocitos 3T3 se mantuvieron por ocho días de post-confluencia en medio osteogénico (MO), MO con 1 μ M de ácido retinoico (MO+AR), MO con 3.8 nM de BMP-2 sola (MO+BMP-2) o con AR (MO+AR+BMP-2), MO con 80 nM de apicidina sola (MO+AP) o con AR (MO+AR+AP), MO con 1 mM de ácido valproico solo (MO+VPA) o con AR (MO+AR+VPA) y MO con 5 nM de tricostatina A sola (MO+TSA) o con AR (MO+AR+TSA). Al cabo, se hicieron extractos citosólicos de los cultivos. Para determinar la actividad de G3PDH, se mezclaron estos extractos con dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y se incubó el tiempo correspondiente al grado de diferenciación adiposa. Finalmente, la reacción se detuvo con SDS al 20% y se determinó su absorbencia a 340 nm.

Figura 11. Efecto de BMP-2 e iHDACs sobre la actividad de fosfatasa alcalina de preadipocitos 3T3 mantenidos en medio adipogénico. Cultivos de preadipocitos 3T3 se mantuvieron por ocho días de post-confluencia en medio adipogénico (MA), MA con 1 μ M de ácido retinoico (MA+AR), MA con 3.8 nM de BMP-2 sola (MA+BMP-2) o con AR (MA+AR+BMP-2), MA con 80 nM de apicidina sola (MA+AP) o con AR (MA+AR+AP), MA con 1 mM de ácido valproico solo (MA+VPA) o con AR (MA+AR+VPA) y MA con 5 nM de tricostatina A sola (MA+TSA) o con AR (MA+AR+TSA). La actividad de fosfatasa alcalina se determinó en los cultivos mediante un kit de reacción (Sigma®).

Figura 12. Efecto de BMP-2 e iHDACs sobre la actividad de fosfatasa alcalina de preadipocitos 3T3 mantenidos en medio osteogénico. Cultivos de preadipocitos 3T3 se mantuvieron por ocho días de post-confluencia en medio osteogénico (MO), MO con 1 μ M de ácido retinoico (MO+AR), MO con 3.8 nM de BMP-2 sola (MO+BMP-2) o con AR (MO+AR+BMP-2), MO con 80 nM de apicidina sola (MO+AP) o con AR (MO+AR+AP), MO con 1 mM de ácido valproico solo (MO+VPA) o con AR (MO+AR+VPA) y MO con 5 nM de tricostatina A sola

(MO+TSA) o con AR (MO+AR+TSA). La actividad de fosfatasa alcalina se determinó en los cultivos mediante un kit de reacción (Sigma[®]).

Figura 13. Cuantificación de la actividad de fosfatasa alcalina de preadipocitos 3T3 mantenidos en medio osteogénico con AR y BMP-2.

Cultivos de preadipocitos 3T3 se mantuvieron por 10 días de post-confluencia en medio osteogénico (MO), MO con 1 μ M de ácido retinoico (MO+AR), MO con 3.8 nM de BMP-2 (MO+BMP-2) y MO con 3.8 nM de BMP-2 y AR (MO+AR+BMP-2). Al cabo, se hicieron extractos citosólicos de los cultivos. Para determinar la actividad de fosfatasa alcalina se mezclaron estos extractos con p-nitrofenil fosfato y se incubó por 45 min. La reacción se detuvo con 0.04 N de NaOH y se determinó su absorbencia a 405 nm.

Figura 14. Cinética de amplificación de los mRNAs para GAPDH, Runx2, fosfatasa alcalina (ALP) y osteocalcina (OC) en preadipocitos 3T3. El RNA total de cultivos preconfluentes de F4 (○) y C4 (□) o de F4 (▽) y C4 (◇) mantenidos por 10 días en medio osteogénico (MO) se aisló con Trizol[®]. Los cDNAs se generaron mediante transcripción reversa y se amplificaron por PCR durante los ciclos señalados en cada caso. Los productos de amplificación se cuantificaron en pixeles con el programa Quantity One (Bio-Rad[®]).

Figura 15. Transcripción de Runx2, fosfatasa alcalina (ALP) y osteocalcina (OC) en preadipocitos 3T3 mantenidos en condiciones osteogénicas. Cultivos de preadipocitos 3T3 se mantuvieron por 10 días de post-confluencia en medio osteogénico (MO), MO con 1 μ M de ácido retinoico (MO+AR), MO con 3.8 nM de BMP-2 (MO+BMP-2) y MO con 3.8 nM de BMP-2 y AR (MO+AR+BMP-2). Al cabo, el RNA total de los cultivos se extrajo con Trizol[®]. Los cDNAs de Runx2, fosfatasa alcalina (ALP) y osteocalcina (OC) se generaron mediante transcripción reversa y se amplificaron por PCR durante 26, 25 y 22 ciclos, respectivamente, empleando oligonucleótidos específicos. Los productos de amplificación se cuantificaron en

pixeles con el programa Quantity One (Bio-Rad®), usando como control el producto de GAPDH.

Figura 16. Efecto de BMP-2 sobre la mineralización de la matriz extracelular de preadipocitos 3T3 mantenidos en medio osteogénico. Cultivos de preadipocitos 3T3 se mantuvieron por 10 días de post-confluencia en medio osteogénico (MO), MO con 1 μ M de ácido retinoico (MO+AR), MO adicionado con 3.8 nM de BMP -2 (MO+BMP -2) y MO con 3.8 nM de BMP-2 y AR (MO+AR+BMP -2). Al cabo, los cultivos se fijaron con formaldehído al 4% y se tiñeron con rojo de alizarina S. El colorante retenido en las monocapas celulares se extrajo con ácido acético al 10% y se cuantificó espectrofotométricamente a 405 nm.

Figura 17. Efecto de BMP-2 sobre la acumulación de proteoglicanos sulfatados y glicoproteínas carboxiladas en preadipocitos 3T3 mantenidos en medio osteogénico. Cultivos de preadipocitos 3T3 se mantuvieron por 10 días de post-confluencia en medio osteogénico (MO), MO con 1 μ M de ácido retinoico (MO+AR), medio osteogénico con 3.8 nM de BMP-2 (MO+BMP-2) y medio osteogénico con 3.8 nM de BMP -2 y ácido retinoico (MO+AR+BMP-2). Al cabo, los cultivos se fijaron con formaldehído al 4% y se tiñeron con azul alciano.

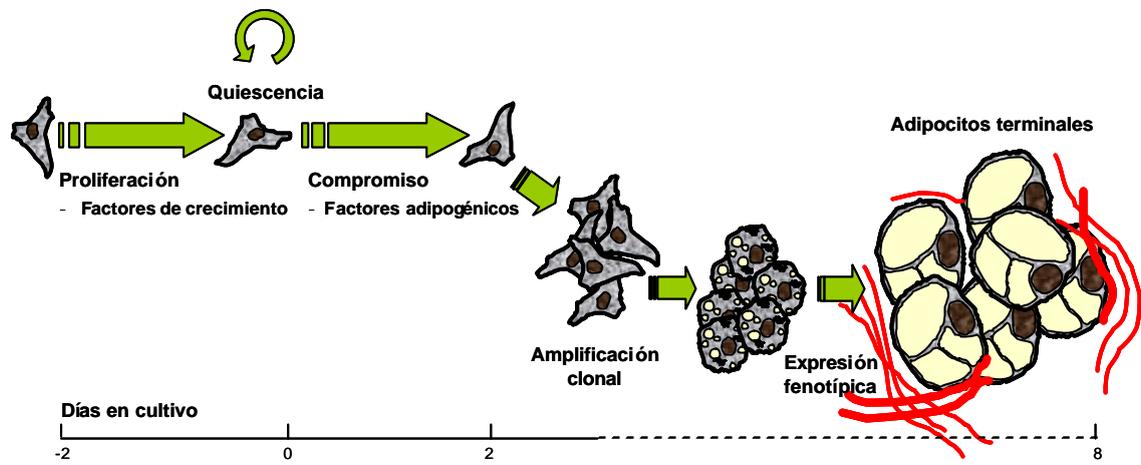


Figura 1. Diferenciación adiposa

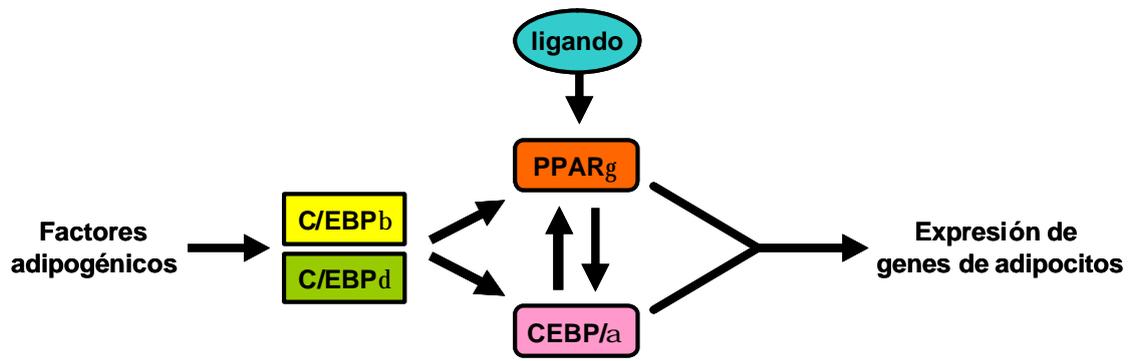
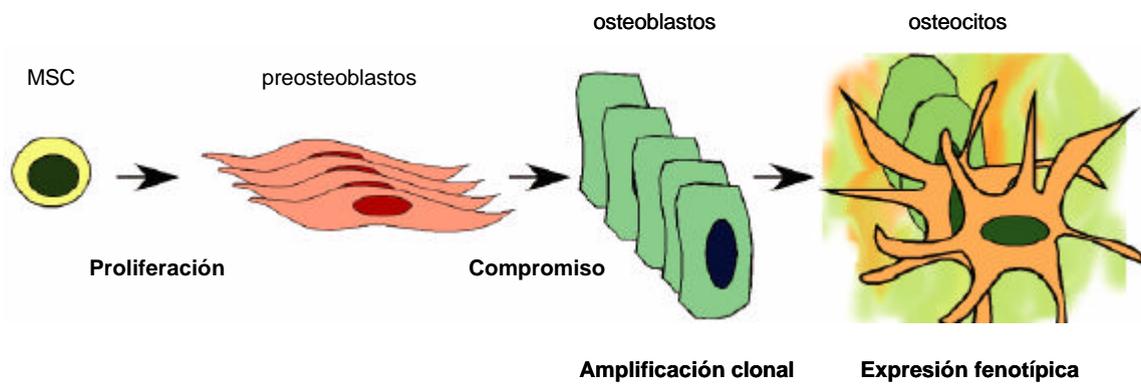
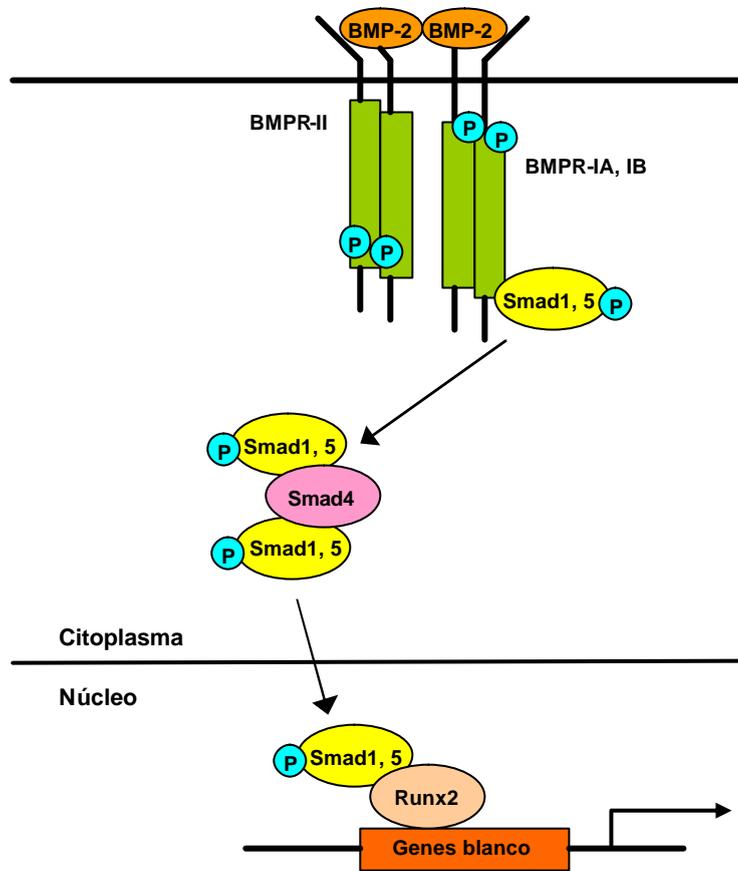


Figura 2. Eventos transcripcionales de la diferenciación adiposa



Modificado de Aguila y Rowe, 2005

Figura 3. Diferenciación osteogénica



Modificado de Fujii y cols, 1999

Figura 4. La vía de señalización de BMP-2

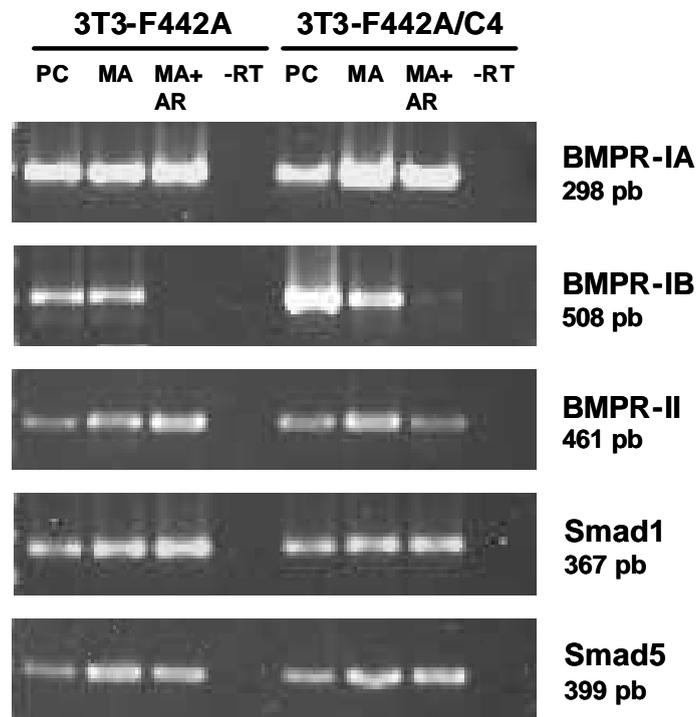


Figura 5. Expresión de la vía de señalización de BMP-2 en preadipocitos 3T3

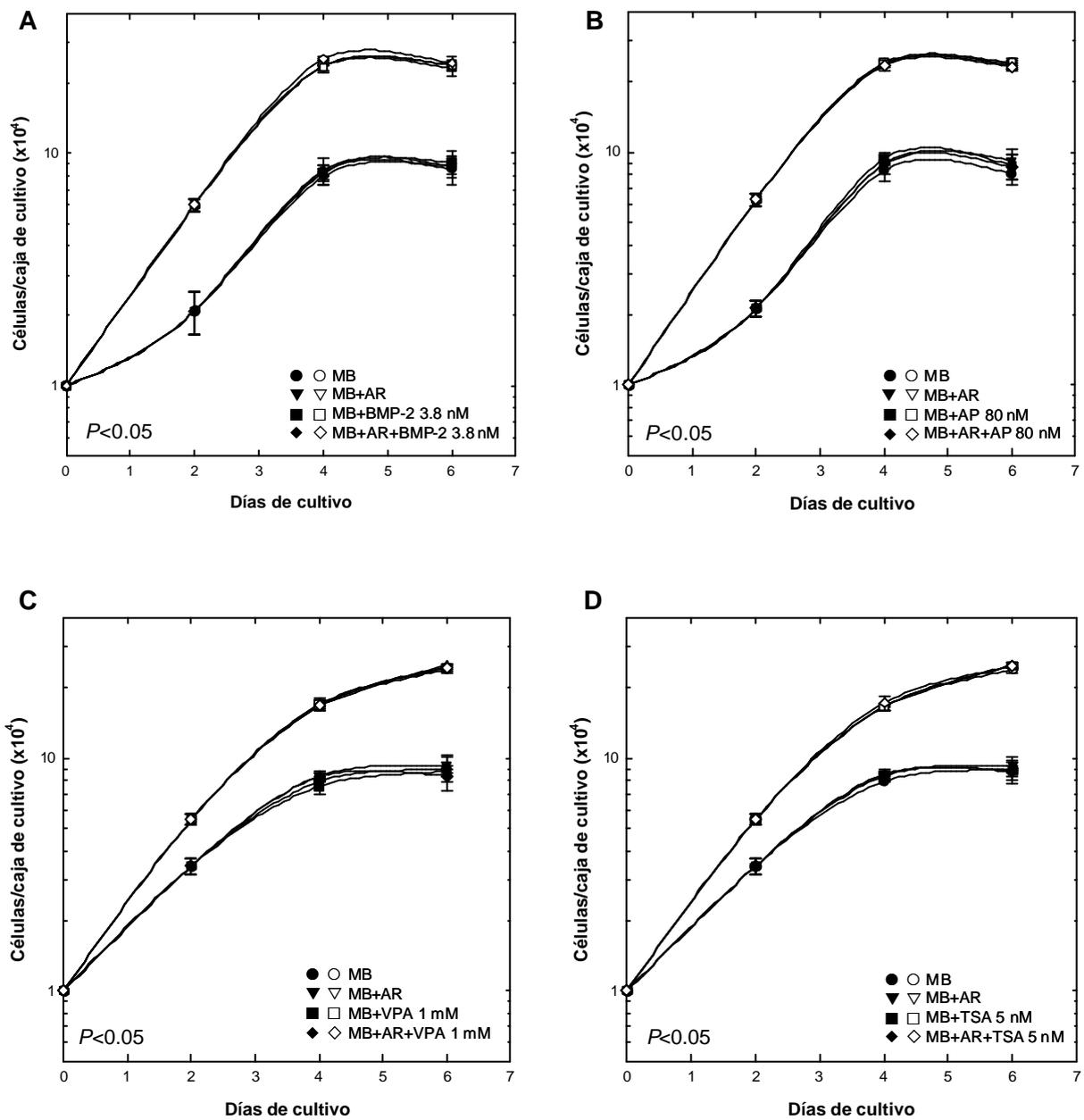


Figura 6. Efecto de BMP-2 e iHDACs sobre la supervivencia de preadipocitos 3T3

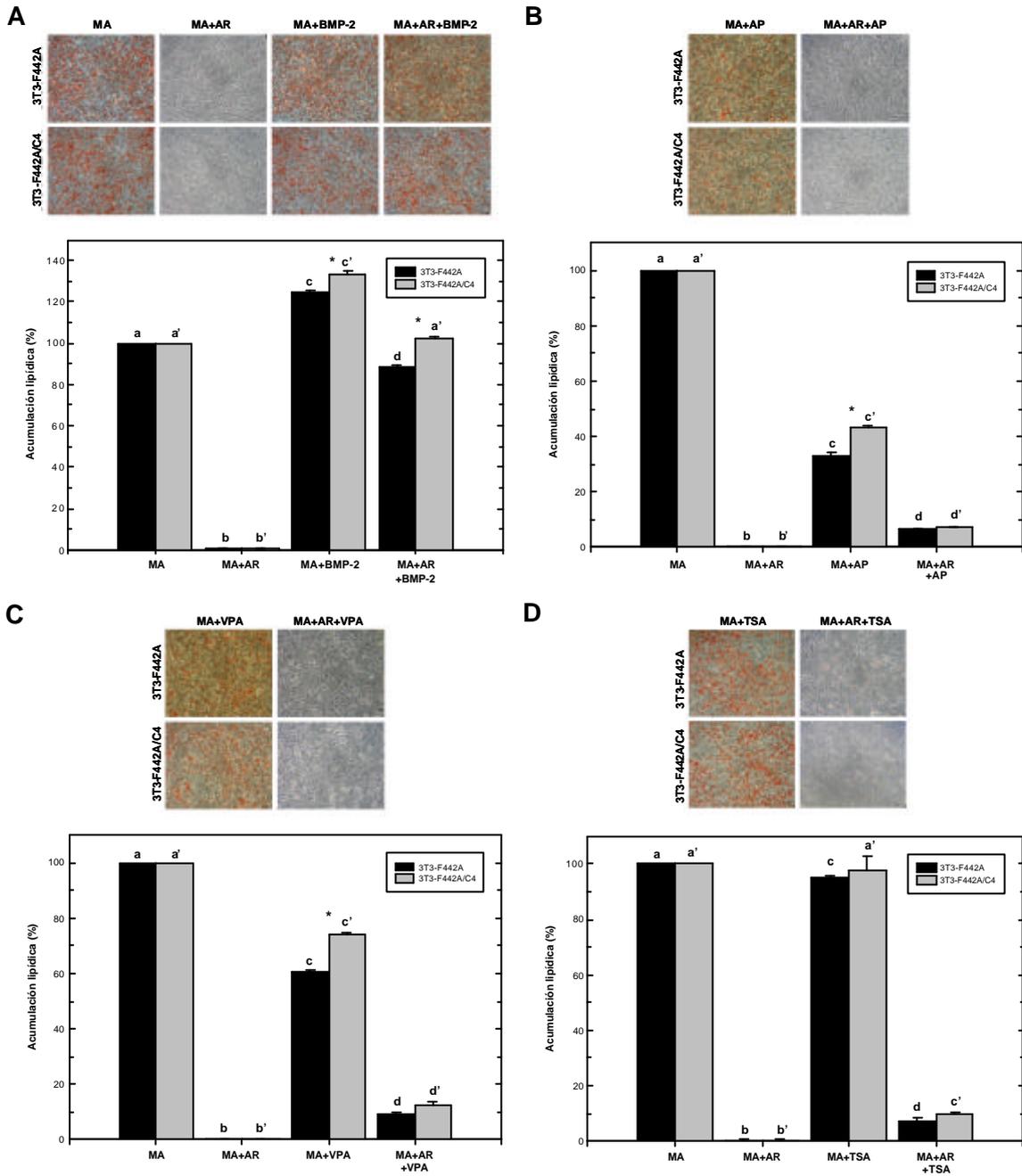


Figura 7. Efecto de BMP-2 e iHDACs sobre la acumulación lipídica de preadipocitos 3T3 mantenidos en medio adipogénico

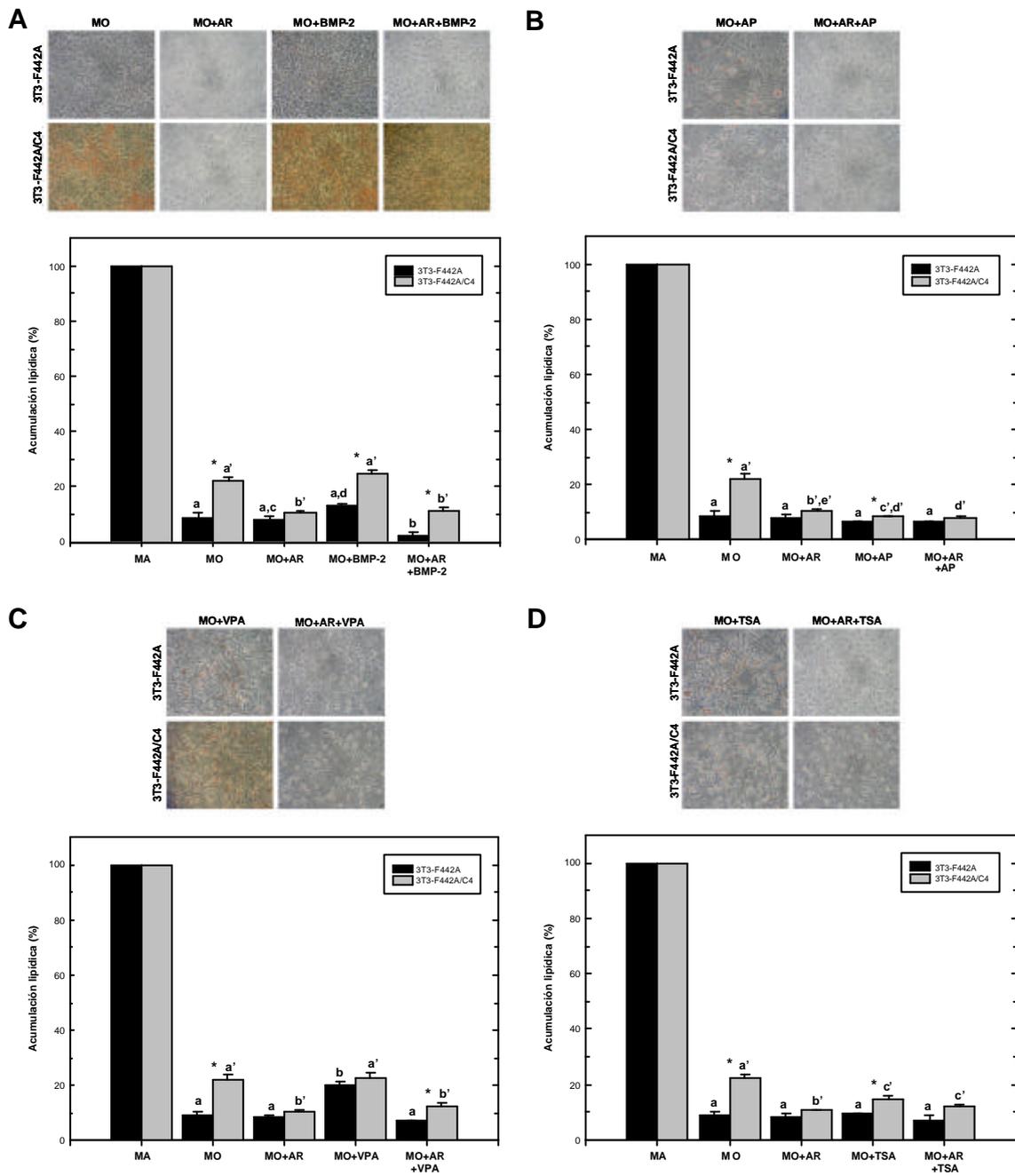


Figura 8. Efecto de BMP-2 e iHDACs sobre la acumulación lipídica de preadipocitos 3T3 mantenidos en medio osteogénico

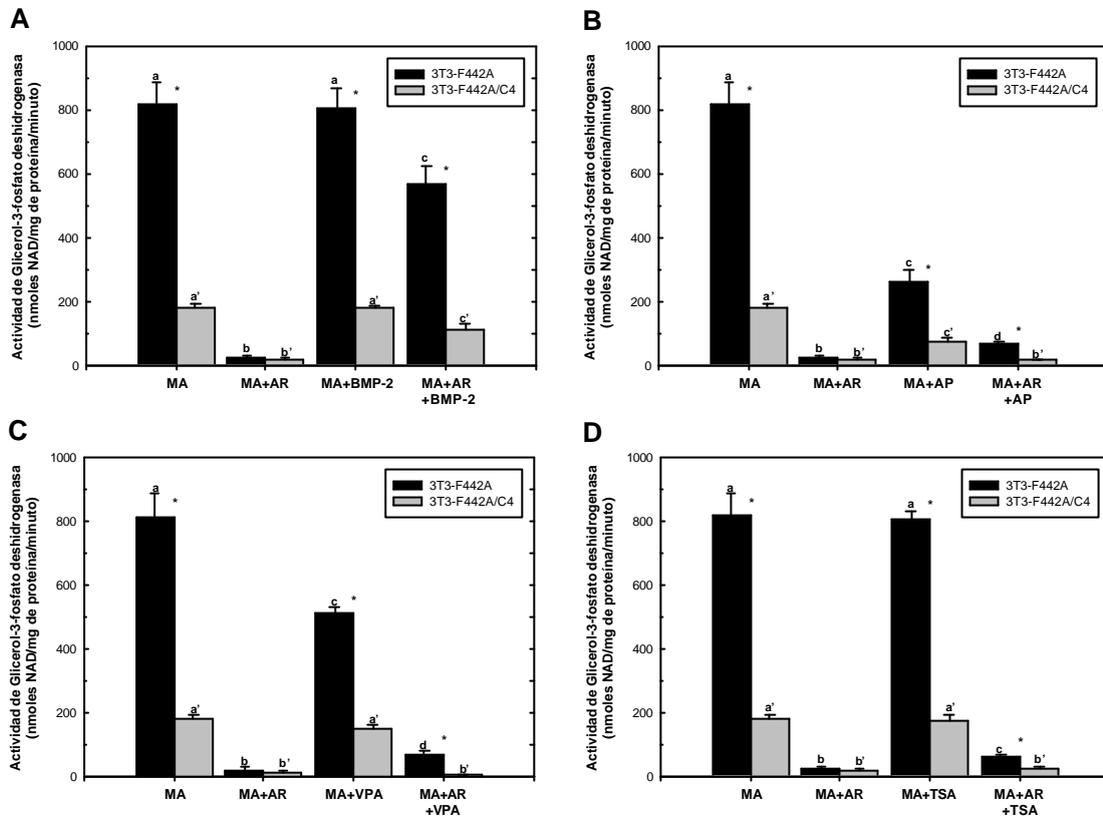


Figura 9. Efecto de BMP-2 e iHDAC s sobre la actividad de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) de preadipocitos 3T3 mantenidos en medio adipogénico

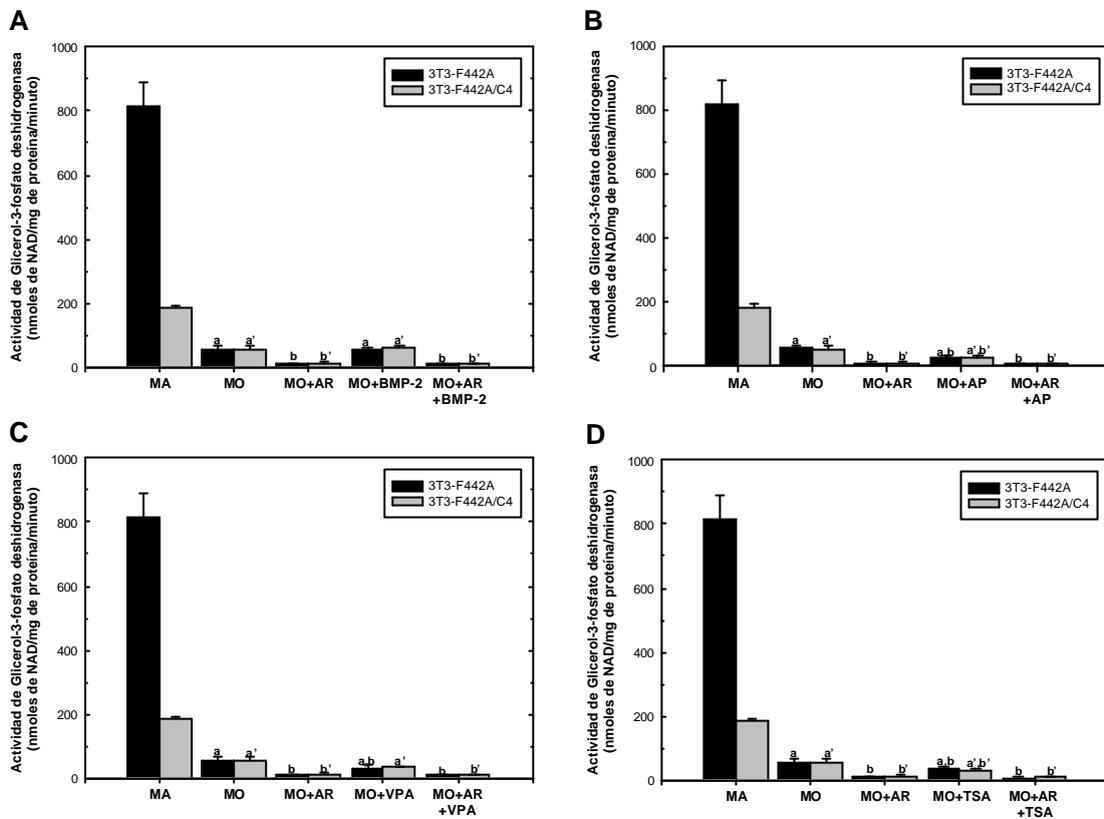


Figura 10. Efecto de BMP-2 e iHDACs sobre la actividad de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) de preadipocitos 3T3 mantenidos en medio osteogénico

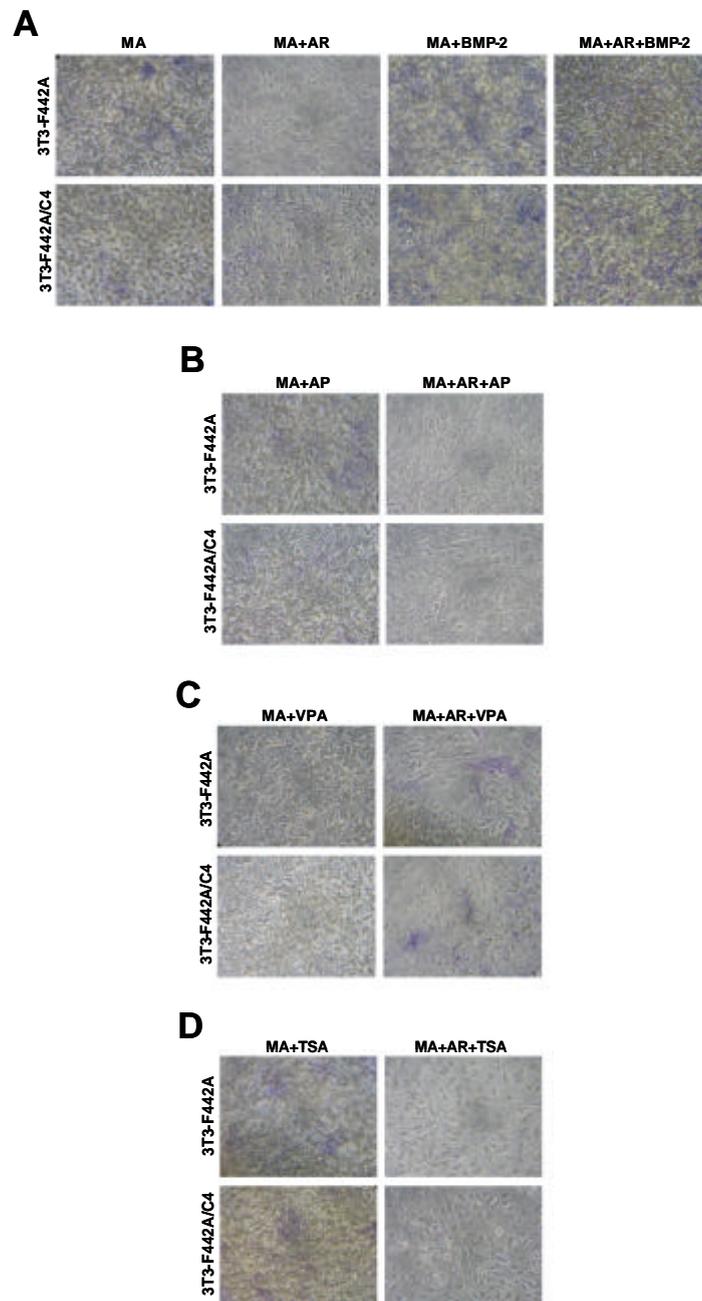


Figura 11. Efecto de BMP-2 e iHDACs sobre la actividad de fosfatasa alcalina de preadipocitos 3T3 mantenidos en medio adipogénico

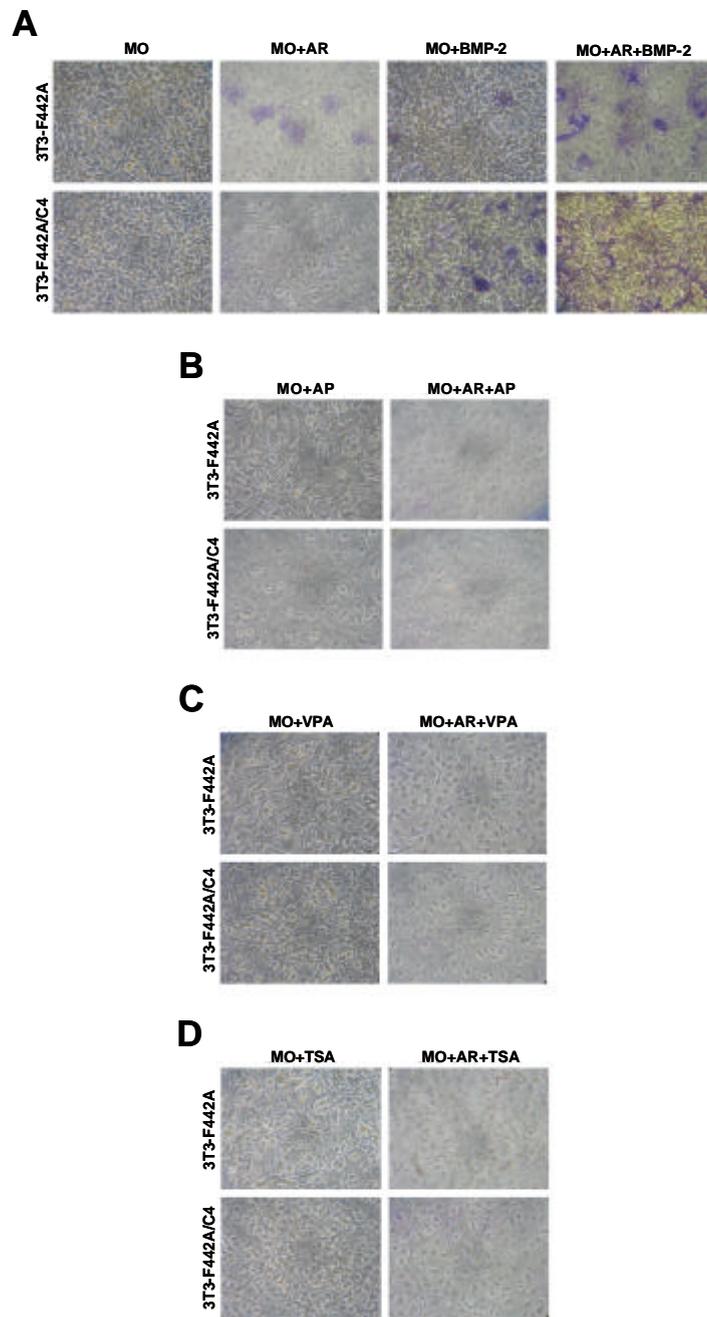


Figura 12. Efecto de BMP-2 e iHDACs sobre la actividad de fosfatasa alcalina de preadipocitos 3T3 mantenidos en medio osteogénico

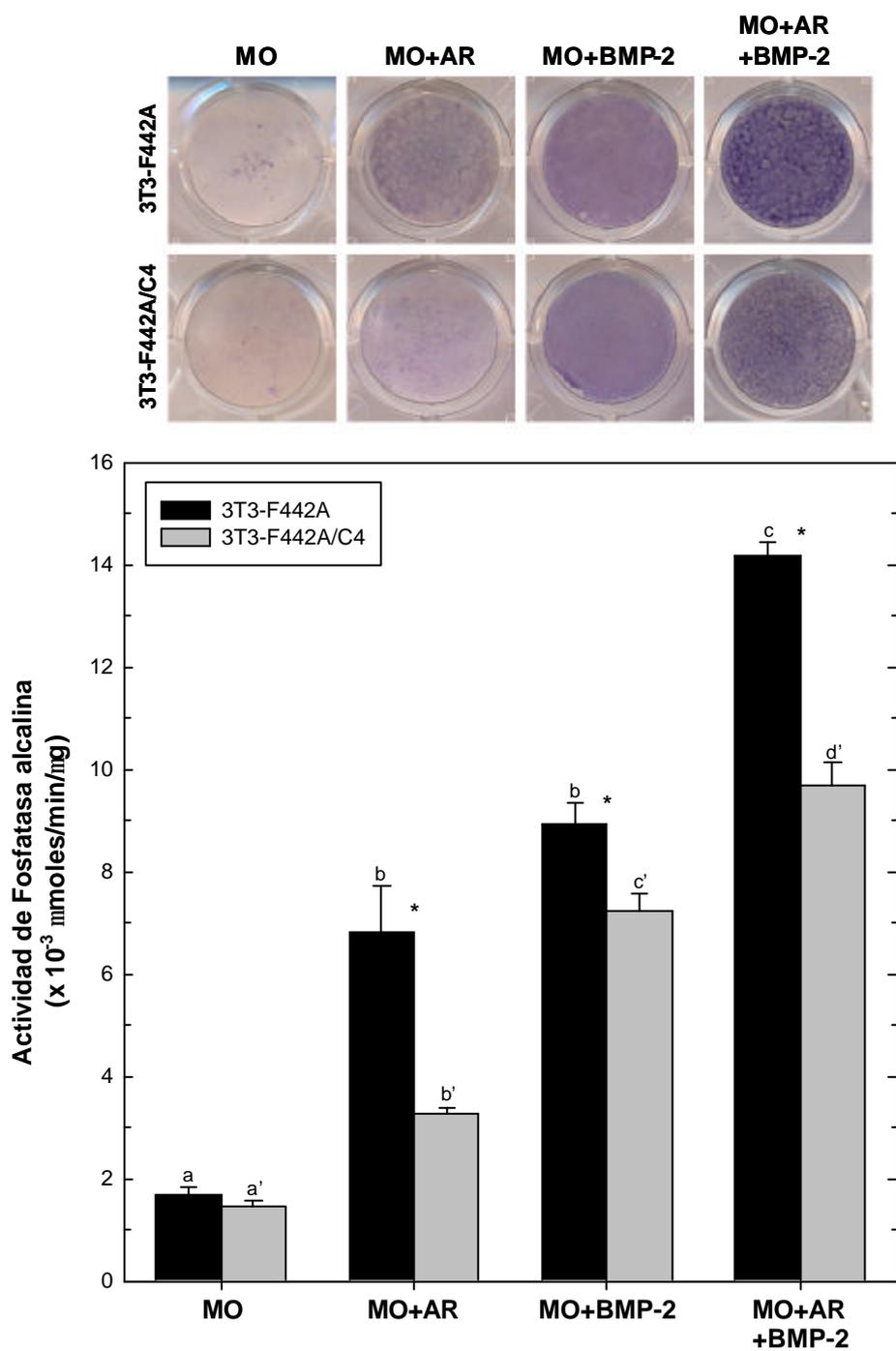


Figura 13. Cuantificación de la actividad de fosfatasa alcalina de preadipocitos 3T3 mantenidos en medio osteogénico con AR y BMP-2

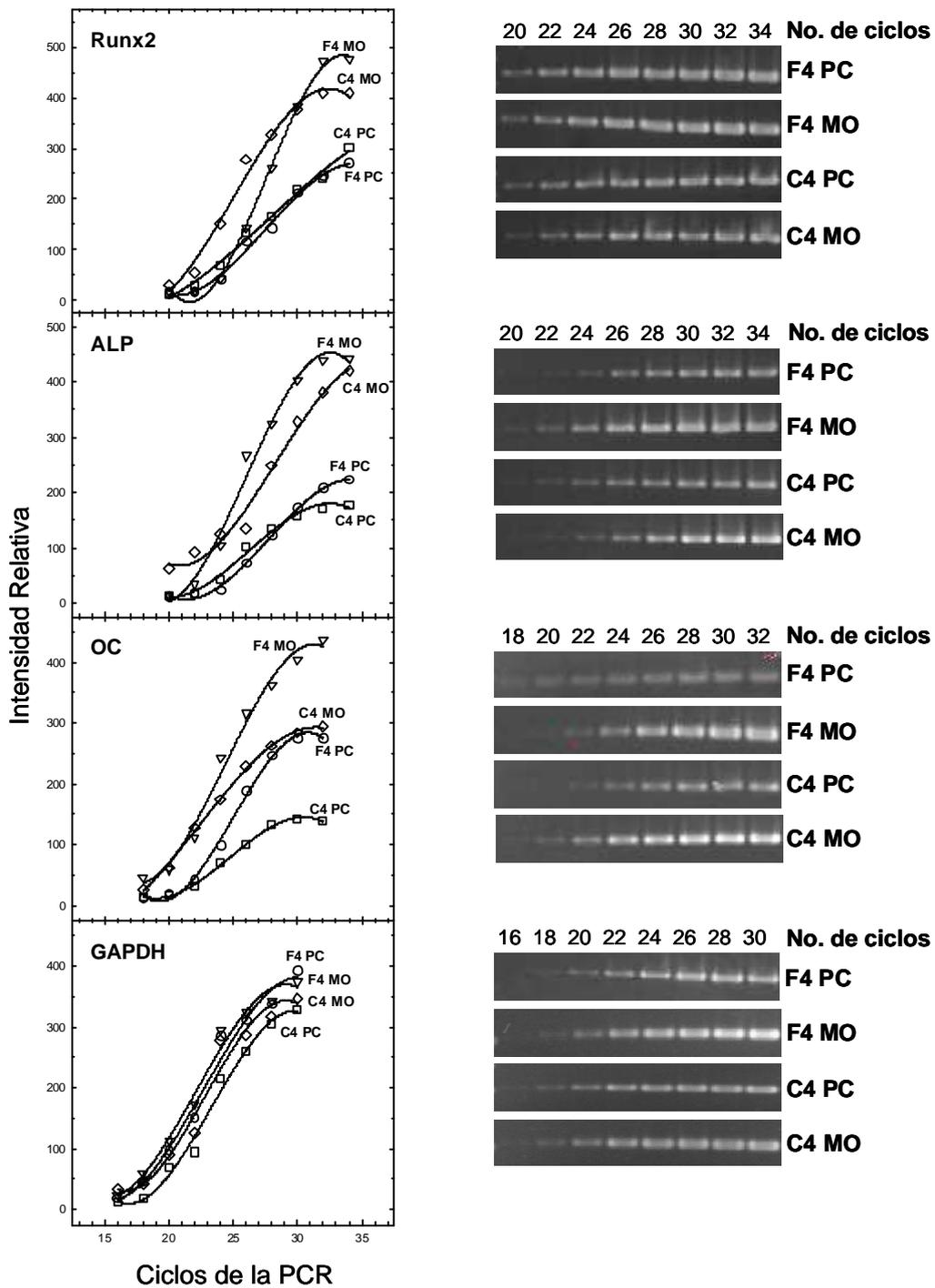


Figura 14. Cinética de amplificación de los mRNAs para GAPDH, Runx2, fosfatasa alcalina (ALP) y osteocalcina (OC) en preadipocitos 3T3

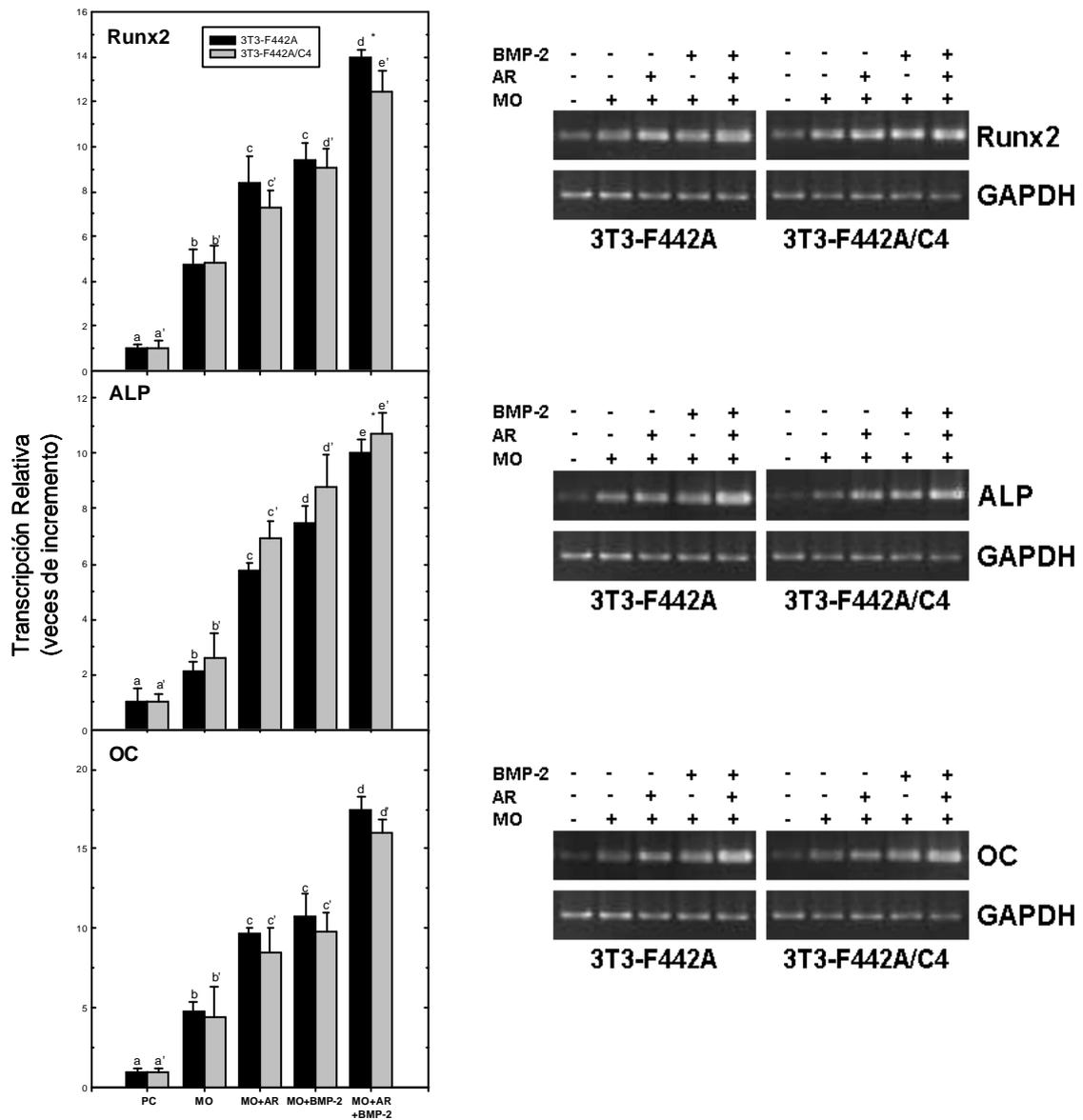


Figura 15. Transcripción de Runx2, fosfatasa alcalina (ALP) y osteocalcina (OC) en preadipocitos 3T3 mantenidos en condiciones osteogénicas

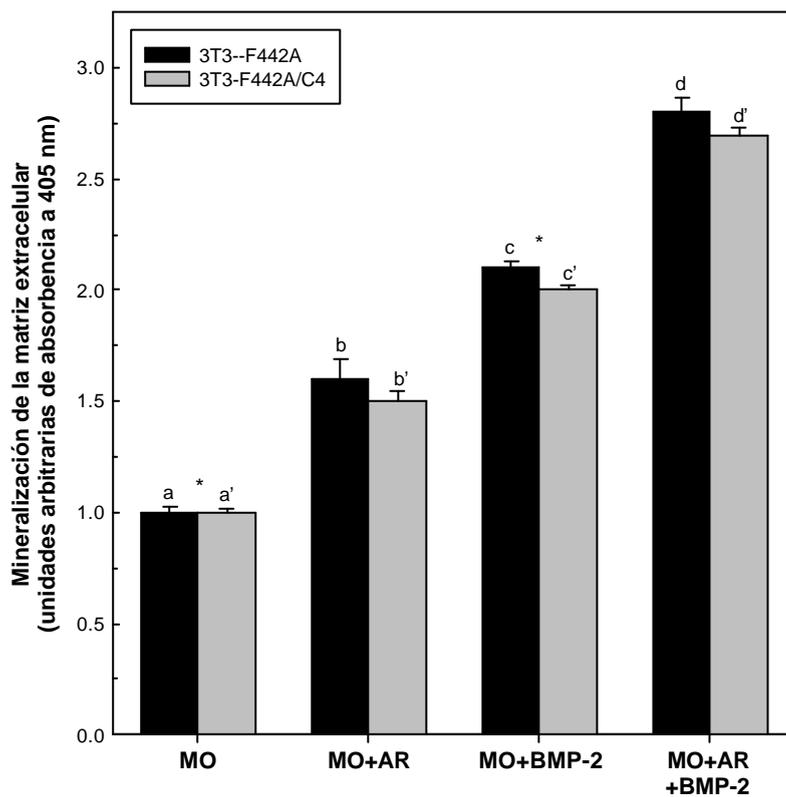
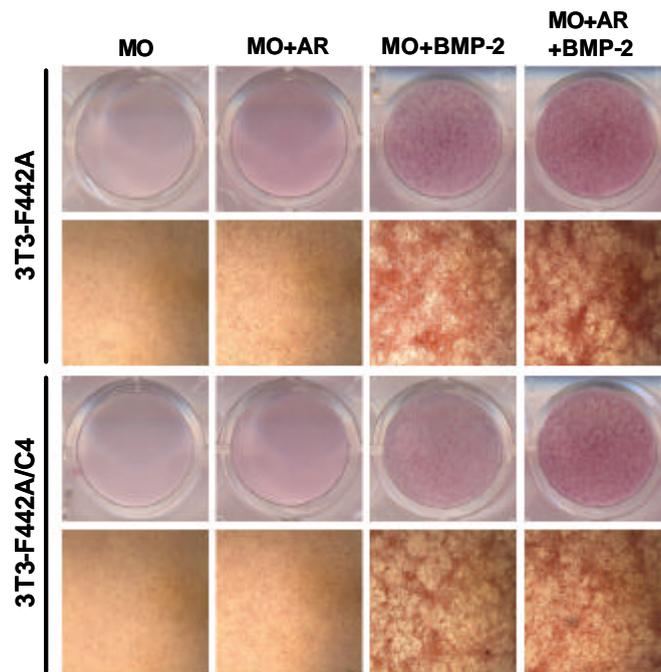


Figura 16. Efecto de BMP-2 sobre la mineralización de la matriz extracelular de preadipocitos 3T3 mantenidos en medio osteogénico

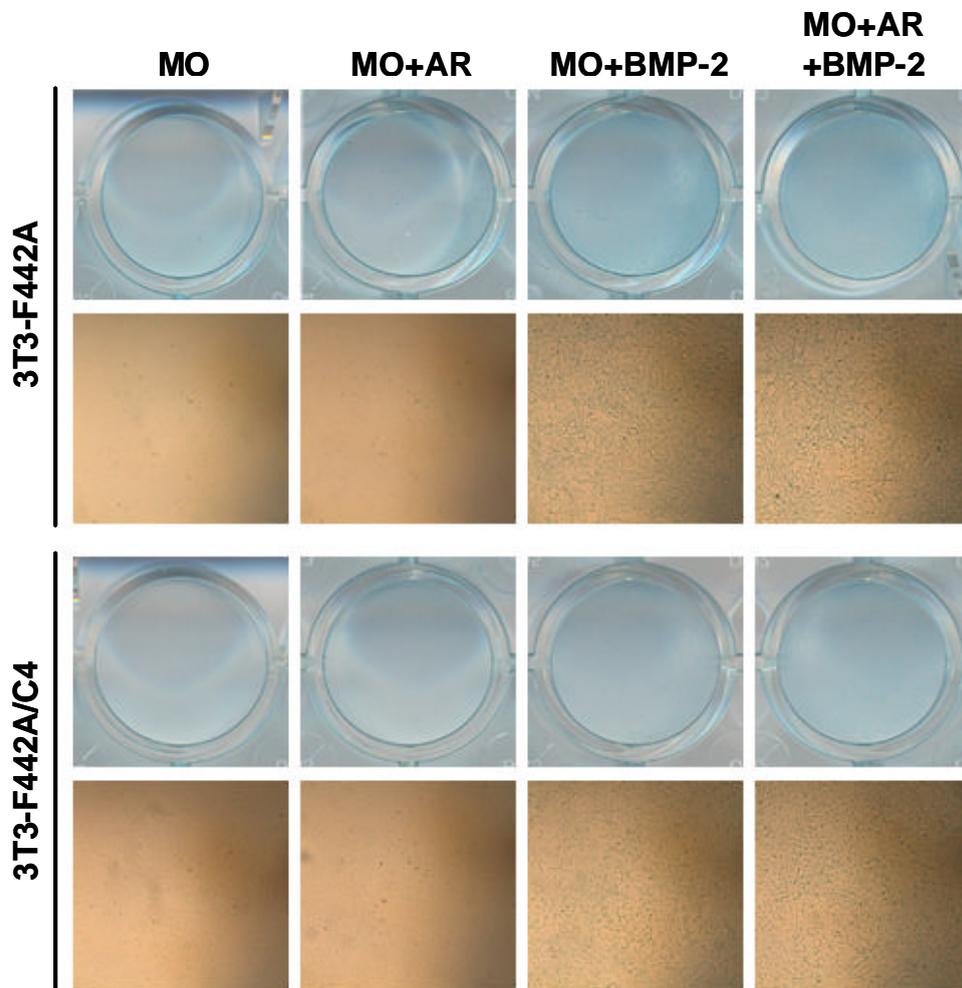


Figura 17. Efecto de BMP-2 sobre la acumulación de proteoglicanos sulfatados y glicoproteínas carboxiladas en preadipocitos 3T3 mantenidos en medio osteogénico