



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

EFFECTOS DE FLAVONOIDES SOBRE LA OSTEOGÉNESIS

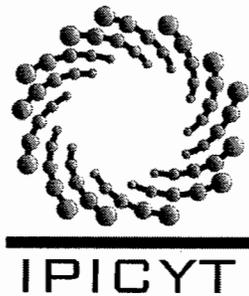
HUMANA IN VITRO

Tesis que presenta
Víctor Manuel Loza González

Para obtener el grado de
Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:
Dr. Luis Antonio Salazar Olivo

San Luis Potosí, S.L.P. 21-junio-2016



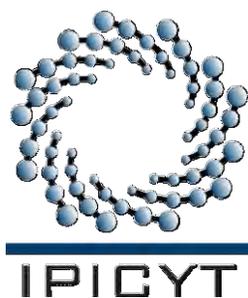
Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "*Efectos de flavonoides sobre la osteogénesis humana in vitro*" presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Victor Manuel Loza González** y aprobada el **veintiuno de junio del dos mil dieciséis** 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
Director de la tesis

Dr. Alejandro de las Peñas Nava
Miembro del Comité Tutorial

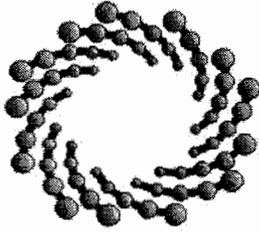
Dr. Rubén Hipólito López Revilla
Miembro del Comité Tutorial



Créditos institucionales

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. La tesis se redactó de acuerdo a las instrucciones para el autor de la revista Bone publicada por la editorial Elsevier

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 297719).



IPICYT

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 Primero del Libro 144 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 21 días del mes de junio del año 2016, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Rubén Hipólito López Revilla
Dr. Alejandro De Las Peñas Nava
Dr. Luis Antonio Salazar Olivo

Presidente
Secretario
Sinodal

IPICYT
IPICYT
IPICYT

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

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Victor Manuel Loza González

sobre la Tesis intitulada:

Efectos de flavonoides sobre la osteogénesis humana in vitro

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Luis Antonio Salazar Olivo

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 13:20 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 21 días del mes de junio de 2016.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

Dr. Marcial Bonina Marín
Secretario Académico



Acta del examen

Página en Blanco que se va a utilizar para colocar la copia del acta de examen.

Dedicatorias

Dedico esta tesis a toda mi familia, en especial a mi madre y mi padre, quienes han sido un apoyo fundamental durante toda mi vida; a mis tíos y padrinos que me asistieron económicamente a lo largo de mis años de estudio; a mi hermano, mis primos y amigos que me han ayudado anímicamente durante toda mi trayectoria.

Sin ustedes no hubiera podido llegar hasta donde me encuentro, todo lo que fui, soy y seré se los debo. Cada vez que contribuya a la salud, bienestar y conocimiento de la sociedad será gracias a la fe que depositaron en mí.

Muéstrame, Señor, tus caminos, enséñame tus senderos. Salmos 25:4.

Agradecimientos

Víctor Manuel Loza González recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 297719).

Agradezco al Dr. Eduardo Álvarez Lozano por la donación de células y a los Dres. Luis Antonio Salazar Olivo, Rubén López Revilla y Alejandro De Las Peñas Nava por su asesoría.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta del examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	viii
Lista de figuras	viii
Resumen	ix
Abstract	x
Introducción	2
Materiales y métodos	6
Cultivo celular	6
Ensayo de viabilidad celular	6
Análisis de marcadores osteogénicos	6
Detección de colágena por tinción con Rojo Picrosirio	7
Microscopía electrónica de barrido	8
Análisis de expresión de genes involucrados en osteogénesis	8
Análisis estadístico	9
Resultados	10
Determinación de concentraciones no tóxicas de ISO para osteoblastos humanos en cultivo	10
ISO aumenta la actividad de fosfatasa alcalina, pero no la concentración de calcio en osteoblastos humanos	10
ISO aumenta la matriz extracelular en osteoblastos humanos	12
ISO induce acumulación de colágena en la matriz extracelular de los osteoblastos humanos	12
ISO aumenta la expresión de <i>COL1A1</i> , pero no de <i>RUNX2</i> ni <i>ALPL</i> .	13
Discusión	14
Conclusiones	18
Pies de las figuras	27
Bibliografía	29

Lista de tablas

Tabla 1. Oligonucleótidos usados para PCR.	19
--	----

Lista de figuras

Figura 1. Efecto de ISO sobre la proliferación <i>in vitro</i> de osteoblastos humanos.	20
Figura 2. Osteogénesis en cultivos de osteoblastos humanos.	21
Figura 3. Actividad de fosfatasa alcalina en osteoblastos humanos.	22
Figura 4. Concentración de calcio en osteoblastos humanos.	23
Figura 5. Micrografías de osteoblastos humanos en diferentes condiciones de cultivo por 3 semanas.	24
Figura 6. Tinción con Rojo Picrosirio de osteoblastos humanos en cultivo.	25
Figura 7. Expresión de genes en osteoblastos humanos.	26

Resumen

Efectos de flavonoides sobre la osteogénesis humana in vitro

La osteoporosis postmenopáusica es la enfermedad ósea más común, con alto impacto en la salud pública. Sin embargo, los fármacos empleados para el tratamiento de la osteoporosis tienen efectos adversos, por lo cual deben desarrollarse medicamentos más eficaces y seguros. Un subgrupo de fitoestrógenos, los flavonoides, son candidatos para tratar la osteoporosis humana porque estimulan la osteogénesis y no tienen efectos adversos. Aquí evaluamos el potencial osteogénico de la isoorientina (ISO), una C-glucosil flavona, sobre cultivos primarios de osteoblastos humanos. La adición de ISO al medio de cultivo osteogénico (MO-ISO) incrementó 20 veces la actividad de fosfatasa alcalina de los osteoblastos en comparación con el medio basal (MB) y no tuvo diferencias significativas con el control positivo de ácido retinoico adicionado al medio osteogénico (MO-AR). La tinción con rojo picrosirio y el análisis por RT-PCR revelaron un incremento en la expresión de colágena tipo 1 de los osteoblastos en MO-ISO respecto a los expuestos a MO. La microscopía electrónica de barrido detectó mayor densidad celular y matriz extracelular más abundante en los cultivos en MO-ISO que en los expuestos a MO. La cuantificación de calcio no mostró diferencias significativas entre los tratamientos. En resumen, ISO aumenta la expresión de marcadores osteogénicos en osteoblastos humanos por lo cual es un buen candidato para desarrollar nuevos tratamientos contra la osteoporosis.

Palabras clave: Isoorientina, osteoporosis, fosfatasa alcalina, colágena.

Abstract

Effects of flavonoids on *in vitro* human osteogenesis

Postmenopausal osteoporosis is the most common bone disease, with high impact on public health. However, the deleterious side effects of medical treatments for osteoporosis make it necessary the development of more effective and safer drugs. A subgroup of phytoestrogens the flavonoids, are candidates for treating human osteoporosis since they stimulate osteogenesis and do not generate adverse side effects on other tissues. Here we evaluated the osteogenic potential of isorientin (ISO), a C-glycosyl flavone, in primary cultures of human osteoblasts. Alkaline phosphatase activity increased by 20 fold in the presence of ISO added to osteogenic medium (MO-ISO) compared to the negative control (basal medium; MB), and did not have significant differences against the positive control (osteogenic medium supplemented with retinoic acid; MO-AR). ISO increased the expression of collagen type 1 respect to the MO control as evaluated by picrosirius red staining and RT-PCR analysis. By scanning electron microscopy we detected higher cell density and increased extracellular matrix in the ISO treated cells than in the MO control. Calcium quantification did not reveal significant differences between the treatments. In summary, ISO increases the expression of several osteogenic markers in primary human osteoblasts; thus ISO is a good candidate for the development of new antiosteoporotic medicines.

KEYWORDS: Isoorientin, osteoporosis, alkaline phosphatase, collagen

Efectos de flavonoides sobre la osteogénesis humana *in vitro*

Víctor Manuel Loza González, Luis A. Salazar-Olivo*

IPICYT, División de Biología Molecular, Camino a la Presa San José 2055, San Luis Potosí 78216, México.

*Autor para correspondencia: E-mail olivo@ipiicyt.edu.mx, Tel: +52(444) 834 2000

Introducción

El hueso es un órgano vascular mineralizado que sirve como reservorio de minerales, resguarda la médula ósea y sirve de anclaje a los músculos [1]. Está formado por una matriz celular y una fase mineral análoga a la hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ [2]. La matriz ósea necesita remodelarse continuamente para mantener la homeostasis del calcio y su integridad estructural [3,4].

La disminución en la formación de hueso y el aumento de su resorción es más prominente en las mujeres que en los hombres y comienza 2 a 3 años antes de la menopausia, con una pérdida de masa ósea de 0.3 a 0.5% cada año [5]. Esto se debe a una disminución en la producción de estrógeno en los ovarios [3] y provoca que las mujeres postmenopáusicas tengan mayor riesgo de padecer osteoporosis conforme envejecen, con el subsecuente aumento en el índice de fracturas y disminución en la calidad de vida [6].

En México el 17.4% de la población es mayor de 50 años, se espera que para el 2050 la proporción llegue a 37%. Las mujeres de este grupo poblacional presentan cifras alarmantes de osteoporosis: 17% en la columna lumbar y 16% en la cadera [7]. Las mujeres tienen una probabilidad de 8.5% de sufrir una fractura de cadera a lo largo de su vida, mientras que los hombres solo tienen un riesgo de 3.8% [8]. Sin embargo los datos estadísticos pueden ser inferiores a las cifras reales, debido a la escasez de equipos de densitometría dual disponibles en el sector público para el diagnóstico de osteoporosis [7]. En México el costo del tratamiento de fracturas de cadera asociadas a la osteoporosis genera gastos de 97 millones de dólares al año [9]. Por lo anterior, la búsqueda de soluciones para

este padecimiento es importante para la salud pública nacional.

Los tratamientos que actualmente se usan en México para tratar la osteoporosis son: los bifosfonados, el ranelato de estroncio, el raloxifeno, la terapia de reemplazo hormonal con estrógenos, el denosumab y el teriparatide [10]. Cada uno tiene sus efectos adversos y se prescriben según la localización de la osteoporosis.

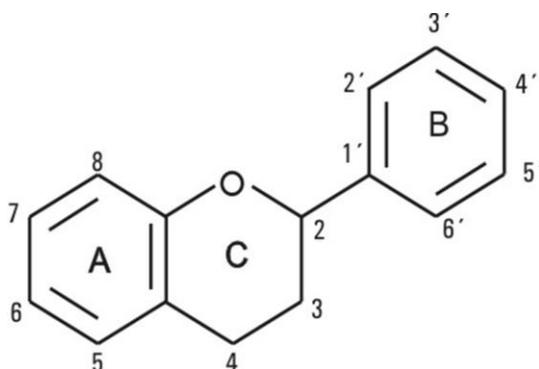
El efecto de la terapia de reemplazo hormonal con estrógenos en los osteoblastos humanos no es del todo clara; sin embargo, se ha visto que disminuye la diferenciación de los osteoclastos, estimula la translocación de β -catenina, activa la vía Wnt [11,12], como efecto adverso incrementa el riesgo de cáncer mamario [13]. Los bifosfonados tienen dos mecanismos de acción según su tipo: un grupo interfiere con GTPasas en los osteoclastos y el otro se convierte en análogos de ATP no hidrolizables. El uso prolongado de los bifosfonados se asocia a osteonecrosis de mandíbula y fracturas atípicas en fémur [14]. El ranelato de estroncio tiene la capacidad de sustituir al calcio en el hueso y disminuir la cantidad de osteoclastos, en cambio el raloxifeno es un agonista selectivo de los receptores de estrógenos. Ambos compuestos aumentan la presentación de eventos tromboembólicos [14].

El denosumab (anticuerpo monoclonal contra el ligando del receptor activador del factor nuclear- $\kappa\beta$; RANKL) y la teriparatida (análogo de la hormona paratiroidea) no presentan efectos adversos, sin embargo el costo de estos tratamientos hace que no se usen de manera cotidiana para tratar la osteoporosis.

Entre los candidatos para desarrollar nuevos medicamentos con menos efectos adversos se encuentran los fitoestrógenos, presentes en plantas. Estos

compuestos se utilizan en la medicina tradicional para tratar la osteoporosis [14]. No obstante, la utilidad de los fitoestrógenos en la prevención de fracturas no es del todo clara, debido a las limitaciones en los estudios en que se han usado [15] y se necesita más investigación para determinar si son efectivos en el tratamiento de la osteoporosis.

Dentro de los fitoestrógenos se encuentran los flavonoides, un grupo amplio de fenoles que aumentan la masa ósea en animales, con efectos adicionales antioxidantes, antiinflamatorios, anticancerosos, antimicrobianos, y cardiovasculares [16,17]. Los flavonoides abarcan a las flavonas, flavonoles, flavanoles, flavanonas, flavanololes chalconas e isoflavonas [18]. Están formados por tres anillos (A-C); las sustituciones químicas en el anillo C generan las diferencias entre las clases de flavonoides, mientras que las diferencias entre los compuestos de una misma clase radican en las sustituciones de los anillos A y B [19].



La isoorientina (ISO) utilizada en este estudio, es una C-glucosil flavona [20]. Se encuentra en plantas de los géneros *Rumex*, *Swertia*, *Vitex* y *Gentiana*; en especies como *Phyllostachys pubescens*, *Crataegus monogyna*, *Crataegus pentagyna*, *Patrinia villosa*, *Drosophyllum lusitanicum*, *Fagopyrum esculentum* y

Arum palaestinum [21,22].

ISO, al igual que otros flavonoides, ejerce efectos pleiotrópicos. Es un neuroprotector en células de microglía en ratones al prevenir oxidación [23], revierte la resistencia a insulina en adipocitos humanos [24], tiene propiedades analgésicas en roedores [21] y causa apoptosis en células humanas de hepatoblastoma [22]. Se ha propuesto que ISO afecta la fosforilación de la vía de la insulina [24], la vía de apoptosis mitocondrial [22] y la activación de cinasas relacionadas a ROS [23].

En este trabajo nos propusimos determinar el potencial antiosteoporótico de ISO. Observamos el efecto de ISO sobre la concentración de calcio, la formación de matriz extracelular y expresión de marcadores de diferenciación ósea [11,16] como colágena tipo 1, fosfatasa alcalina y *RUNX2* [25,26].

El gen *RUNX2* que codifica RUNX2 es un factor de transcripción esencial para la diferenciación de células mesenquimales en osteoblastos. Además, interacciona con el receptor de estrógenos α en los osteoblastos y regula la expresión de colágena tipo 1, fosfatasa alcalina y osteopontina [27].

La colágena tipo 1 y la fosfatasa alcalina son necesarias para producir la matriz ósea [28]. La colágena tipo 1 es la proteína más abundante en la matriz extracelular ósea. La fosfatasa alcalina es una enzima que contribuye a mineralizar la colágena al proveer fosfatos. La actividad de fosfatasa alcalina cambia durante la diferenciación ósea, está ausente en los precursores mesenquimales y se incrementa durante la diferenciación del osteoblasto y alcanza su pico de actividad al inicio de la mineralización [29].

Materiales y métodos

Cultivo celular

Los osteoblastos humanos provinieron de cultivos establecidos a partir de una biopsia femoral de una paciente de 49 años de edad (Gómez-Espinoza, Salazar-Olivo, resultados no publicados), donada por el Dr. Eduardo Álvarez Lozano, de la Fac. de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. Las células se cultivaron en medio L15 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (HyClone) y antibióticos (penicilina 80 U/ml y estreptomina 80 µg/ml) (Medio basal; MB) [24]. ISO se obtuvo de Chromadex, (95.7% de pureza), el β glicerofosfato, la dexametasona, el ácido ascórbico y el ácido retinoico (AR; 98% de pureza) provinieron de Sigma-Aldrich.

Ensayo de viabilidad celular

Los osteoblastos humanos se sembraron en placas de cultivo de 24 pozos a una densidad de 1×10^4 células/pozo en MB. Después de 2 días, los cultivos se realimentaron con MB suplementado con ISO en concentraciones crecientes. Las células se incubaron en una atmósfera humidificada a 37 °C, con cambio de medio cada dos días. La viabilidad celular se evaluó mediante recuentos en hematómetro.

Análisis de marcadores osteogénicos

Los osteoblastos humanos se sembraron en placas de cultivo de 24 pozos a una densidad de 1×10^4 células/pozo con MB. Los cultivos confluentes se diferenciaron con medio osteogénico (MO; medio basal con dexametasona 10 nM, ácido ascórbico 50 µg/ml y β-glicerofosfato 10 mM) [30], suplementado con distintas concentraciones de ISO. Cultivos en MB se usaron como control

negativo, en tanto que cultivos en MO adicionado con AR 1 μ M (MO-AR) se utilizaron como control positivo de osteogénesis [31]. Se evaluó la actividad de fosfatasa alcalina por tinción y colorimetría. La concentración de calcio se cuantificó por colorimetría en los distintos tratamientos.

La fijación de las células y la tinción de fosfatasa alcalina se realizaron con el Kit Leukocyte Alkaline Phosphatase (Sigma-Aldrich; 85L2) según las instrucciones del fabricante. Para extraer y cuantificar la proteína total en las muestras, las células se incubaron por 15 min con amortiguador de extracción (Tris/HCl 50 mM con Tritón X-100 al 1%, PH 7.5) [32], los remanentes celulares se desprendieron con espátula de goma y la suspensión resultante se sonicó en hielo [33]. La proteína total se cuantificó mediante el método de Bradford [34]. La actividad de fosfatasa alcalina se calculó con las absorbancias registradas con el multidetector Beckman Coulter DTX 800 a 410 nm [35]. Las muestras se incubaron en placas de 96 pozos a 37°C en oscuridad durante 3 h con 20 μ g de proteína total por pozo y 90 μ l de p-nitrofenil fosfato (Sigma-Aldrich N 7653).

La concentración de calcio se cuantificó con las absorbancias a 575 nm y una curva de calibración de calcio. Las placas de 96 pozos se cargaron con 60 μ g de proteína total/pozo, HCL 10 mN, agua destilada, solución A (0.75% p/v de cloruro de amonio en solución de amoniaco) y solución de cresoftaleína (Sigma-Aldrich) según el método descrito por Pollard [36] en un volumen final de 200 μ l.

Detección de colágena por tinción con Rojo Picrosirio

Los osteoblastos humanos se sembraron a densidad de 1 x 10⁴ células/pozo en una placa de cultivo 24 pozos y se mantuvieron por una semana en condiciones basales. Una vez en confluencia, el MB se conservó en dos pozos y

los pozos restantes se mantuvieron en las siguientes condiciones por duplicado: MO, MO-ISO 5 μ M (MO-ISO) y MO-AR. El medio se cambió cada dos días durante 3 semanas. Las células se fijaron con formaldehído al 3.7% en PBS (tampón fosfato salino) [29] por 1 h a 4°C, se lavaron en agua y se dejaron secar. La colágena en las muestras se detectó mediante la tinción con rojo picrosirio del kit de Polysciences Inc. de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Microscopía electrónica de barrido

Los osteoblastos humanos se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio de 13 mm de diámetro con inóculos de 4×10^4 células. Una vez confluentes se mantuvieron por 3 semanas en MB, MO, MO-ISO y MO-AR. Al término del experimento las células se fijaron con glutaraldehído al 2% en PBS, pH 7.4 [12], durante 4 h a temperatura ambiente. Las micrografías se tomaron con un microscopio electrónico de barrido ambiental ESEM FEI-QUANTA 200.

Análisis de expresión de genes involucrados en osteogénesis

Cultivos de osteoblastos humanos mantenidos en MB, MO, MO-ISO o MO-AR se lisaron con TRIzol (Sigma). El RNA total se aisló de acuerdo al protocolo del fabricante y se cuantificó por espectrometría a O.D. 260 nm. Para eliminar el DNA genómico, las muestras se incubaron con DNAsa I (Sigma-Aldrich). Obtuvimos la expresión de genes involucrados en diferenciación ósea mediante retrotranscripción del RNA total con la transcriptasa reversa M-MLV RT (Promega) según las instrucciones del fabricante. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa. Se usaron oligonucleótidos específicos para *COL1A1* (colágena tipo 1), *RUNX2* (Factor 2 de transcripción relacionado a Runt) y *ALPL* (fosfatasa alcalina). *GAPDH* (gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa humana) se usó como

gen constitutivo [37]. Las intensidades relativas de las bandas se cuantificaron con el programa Image Lab 5.2.1 (Bio-Rad).

Análisis estadístico

Los datos se presentan como la media \pm SEM (error estándar de la media) de dos experimentos por duplicado. Los resultados se evaluaron por ANOVA de dos vías y prueba de Tukey para comparaciones múltiples. Los valores de $P \leq 0.005$ se consideraron estadísticamente significativos.

Resultados

Determinación de concentraciones no tóxicas de ISO para osteoblastos humanos en cultivo

Para evaluar el potencial osteogénico de ISO primero determinamos las concentraciones no tóxicas del compuesto para osteoblastos humanos. Las células expuestas a ISO en concentraciones de 1 a 50 μM no mostraron diferencias estadísticamente significativas de proliferación respecto a las células en MB. Solo ISO 100 μM disminuyó el crecimiento celular en un 15% (Fig.1). Para los ensayos subsecuentes utilizamos ISO a concentraciones de 1, 5 y 50 μM .

ISO aumenta la actividad de fosfatasa alcalina, pero no la concentración de calcio en osteoblastos humanos

Para establecer si ISO estimula la osteogénesis, evaluamos sus efectos sobre la actividad de fosfatasa alcalina y la concentración de calcio en osteoblastos humanos. La actividad de fosfatasa alcalina se apreció de manera cualitativa mediante tinción. Los osteoblastos con actividad enzimática adquirieron un tinte azul. Comparamos el periodo con mayor intensidad de tinción (semana 3; Figs. 2D, 2F, 2H, 2J), contra el de menor intensidad (semana 1; Figs. 2C, 2E, 2G, 2I). Las células en MB no tuvieron tinte azul durante el ensayo (Figs. 2A-B). Los osteoblastos humanos exhibieron mayor actividad enzimática en MO-ISO 1 y 5 μM (Figs. 2F y 2H). Esta última concentración generó actividad enzimática en las células desde la primera semana de tratamiento (Fig. 2G). La actividad enzimática de las células en MO-ISO 50 μM (Fig. 2J) fue menor que la de osteoblastos en

MO-ISO 1 y 5 μM (Figs. 2F y 2H). Las células en MO-AR (Fig. 2D) mostraron mayor actividad de fosfatasa alcalina que las cultivadas en MB (Fig. 2B) durante la tercera semana de tratamiento.

Para corroborar los resultados previos cuantificamos la actividad de fosfatasa por colorimetría. Dado que los osteoblastos en MB incrementaron su actividad enzimática durante la cuarta semana de tratamiento (sin significancia con el resto de semanas de la misma condición), los resultados con mayor significancia estadística ocurrieron en la tercera semana del experimento. Las células en MO-ISO 1 μM aumentaron su actividad 5.4 veces en la cuarta semana en comparación al control en MB (Fig. 3). En cambio, MO-ISO 5 μM aumentó la actividad enzimática de los osteoblastos humanos en 20.2 veces y 6.4 veces respectivamente durante la tercera y cuarta semana (Fig. 3). Las células expuestas a MO-AR incrementaron su actividad 15.1 veces durante la tercera semana y 4.8 veces durante la cuarta semana (Fig. 3). Estos resultados indican que ISO produce mayor actividad de fosfatasa alcalina durante la tercera y cuarta semanas de tratamiento.

Debido a que el calcio se deposita en la matriz extracelular durante la diferenciación de los osteoblastos, cuantificamos su concentración en cultivos expuestos a distintos tratamientos. Las concentraciones de calcio en osteoblastos durante las cuatro semanas tanto en MB como en MO con distintas concentraciones de ISO no tuvieron diferencias significativas (Fig. 4). Los osteoblastos humanos en MO-AR incrementaron 1.9 veces su concentración de calcio en relación al MB durante la tercera semana (Fig. 4). Apreciamos un

descenso en la cantidad de calcio en todas las células durante la segunda semana, sin importar su condición (Fig.4).

ISO aumenta la matriz extracelular en osteoblastos humanos

Para evaluar el efecto de ISO sobre la morfología celular y la formación de matriz extracelular, observamos a las células mediante microscopía electrónica de barrido. El MB indujo múltiples prolongaciones citoplásmicas y mayor espacio intercelular en los osteoblastos humanos (Fig. 5A). Los osteoblastos en los otros tratamientos adquirieron abundante matriz extracelular, múltiples vesículas alrededor de las células y poco espacio intercelular (Figs. 5B-D). Los osteoblastos en MO-ISO (Fig. 5D) presentaron más vesículas y matriz extracelular que en MO (Fig. 5C). Las células en MO-AR (Fig. 5B) exhibieron apariencia fusiforme y entrecruzada entre las células, con menos vesículas que los osteoblastos en MO-ISO o en MO (Figs. 5C-D). No pudimos determinar la composición de las vesículas en la matriz extracelular por espectroscopía de energía dispersiva de rayos X, debido a las interferencias que causó el vidrio sobre el que se cultivaron las células.

ISO induce acumulación de colágena en la matriz extracelular de los osteoblastos humanos

Para comparar la presencia de depósitos de colágena, teñimos con rojo picrosirio la matriz extracelular de osteoblastos humanos cultivados en distintas condiciones. Las células en MB no tuvieron depósitos de colágena durante la primera semana de cultivo (Fig. 6A). Todos los cultivos adquirieron depósitos de

colágena extracelular en la tercera semana de cultivo sin importar el tratamiento (Fig.6B-E). La matriz extracelular de los osteoblastos humanos en MO-ISO tuvo la tinción más intensa, con tonalidades predominantemente amarillas que indican la presencia de colágena tipo 1 (Fig. 6D). La matriz de los cultivos en MO (Fig. 6C) adquirió un tono amarillo más intenso que el de osteoblastos en MB (Fig. 6B), pero más tenue que el de células en MO-ISO (fig. 6D). Los osteoblastos humanos en MO-AR tuvieron depósitos de colágena con distribución irregular y coloración roja debido a presencia de colágenas adicionales a colágena 1 (Fig. 6E).

ISO aumenta la expresión de *COL1A1*, pero no de *RUNX2* ni *ALPL*.

Para intentar comprender los mecanismos moleculares por los que ISO estimula la osteogénesis, evaluamos la expresión de genes que codifican proteínas involucradas en la diferenciación del osteoblasto: *RUNX2* (Factor 2 de transcripción relacionado a Runt); *ALPL* (fosfatasa alcalina) y *COL1A1* (colágena tipo 1). *GAPDH* (gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa humana) fue el gen constitutivo en el estudio. Los oligonucleótidos usados en este trabajo se presentan en la Tabla 1.

La expresión de *ALPL* y *RUNX2* fue similar en las células expuestas a MO, MO-ISO y MO-AR, en tanto que las células en MB no expresaron ninguno de los dos marcadores después de 3 semanas de cultivo (Fig. 7A). Los osteoblastos en todas las condiciones expresaron *COL1A1*, pero la intensidad relativa de banda fue mayor en cultivos expuestos a MO-ISO y MO-AR (Fig. 7B).

Discusión

ISO es una C-glucosil flavona con actividad antioxidante que inhibe la 15-lipooxigenasa y la xantina oxidasa [38]. Además previene la oxidación de lipoproteínas de baja densidad [39] y estimula la transcripción de genes involucrados en la vía de señalización de insulina (*IR*, *IRS1*, *IRS2*, *PI3K*, entre otros) [24]. Es posible que tenga otros efectos, como inducción de osteogénesis, dado que su análogo no glucosilado favorece la formación de depósitos de calcio en células Saos2 [40].

Observamos disminución en el número de osteoblastos humanos expuestos a concentraciones altas de ISO durante el ensayo de viabilidad celular, lo que concuerda con datos presentados en otro estudio [24]. Los efectos de ISO son heterogéneos en diferentes estirpes celulares y la concentración para su estudio varía según el modelo usado [22]. No hay evidencia de que ISO altere la viabilidad celular en concentraciones menores de 20 μM en líneas celulares no derivadas de tumores [22–24].

El MO-ISO 1 y 5 μM aumentó significativamente la actividad de fosfatasa alcalina en los osteoblastos humanos: no obstante, las células en MO-ISO 50 μM no tuvieron diferencias con el control negativo. Esto puede deberse a alteración en la oxidación celular durante tratamientos prolongados con ISO a concentraciones altas. Se ha visto que los flavonoides a dosis altas generan especies reactivas de oxígeno [41].

Nuestros resultados mostraron una disminución significativa del calcio en todos los tratamientos después de la primera semana de cultivo. Esto puede

originarse por la pérdida de calcio remanente del tejido óseo. Los niveles bajos de calcio en las células expuestas a ISO pueden deberse a la falla en la detección del mineral en la forma no iónica de hidroxapatita. El método colorimétrico que usamos mide el cambio de coloración de la cresoftaleína al quelarse con iones de calcio [42], sin embargo la presencia de quelantes en la muestra y la ausencia de calcio en forma iónica limitan la efectividad del método.

Los resultados de la tinción con rojo picrosirio revelan que las células producen colágena a pesar de no estar presentes en medios de inducción, lo que indica que retienen su capacidad natural de síntesis en cultivo *in vitro*. La tinción con rojo picrosirio tiene la ventaja de ser específica para colágena, no tiene efectividad en fibronectina, un componente altamente secretado por precursores del osteoblasto [43]. Observamos predominio de colágena 1 en células expuestas a ISO, en contraste con los osteoblastos cultivados en MO-AR que presentaron combinación de colágena 1 y 3.

El análisis por PCR para *COL1A1* reveló que el MO-ISO 5 aumenta la producción de colágena en las células, un efecto ya observado en otros flavonoides [44]. El MO-AR incrementó la presencia de colágena en concordancia con resultados obtenidos en células múridas [45], en contraste con lo reportado en la literatura en humanos [37]. El análisis por PCR de marcadores osteogénicos, no generó diferencias en la expresión de *ALPL* en comparación al MO, esto sugiere que el aumento de actividad de fosfatasa alcalina generado por ISO en los otros experimentos es a un nivel postranscripcional. Basándonos en los patrones de la expresión de *RUNX2* suponemos que ISO no tiene efectos aditivos al MO en este marcador.

Los osteoblastos expuestos a ISO presentaron actividad de fosfatasa alcalina y expresaron colágena tipo 1, esto concuerda con lo visto en otros flavonoides [32]. La manera en que ISO ejerce sus efectos en la osteogénesis puede ser similar a otros flavonoides por influencia sobre los receptores estrogénicos α y β [38], o mediante la activación de la vía WNT [40], aunque se requieren de más estudios para confirmarlo.

El MO-AR aumentó la actividad de fosfatasa alcalina, el calcio y la colágena en los osteoblastos lo que concuerda con otros estudios [35,45] en los que el AR induce por si solo la actividad de fosfatasa alcalina en células mesenquimales múridas. A pesar de lo anterior, los efectos del AR sobre la osteogénesis en humanos son controversiales. Hay evidencia de que influye en la diferenciación terminal hacia osteocitos [45], pero también aumenta la expresión de marcadores de resorción ósea (RANKL) [37]. Los resultados obtenidos en este estudio pueden ser ocasionados por la adición del MO al AR. Aunque por si solo el MO no probó ser superior al MB en experimentos previos del laboratorio para inducir la actividad de fosfatasa alcalina (datos no mostrados), la combinación de estos dos elementos generó un incremento significativo de este marcador en comparación con el MB. La manera en que ocurre este efecto aditivo se desconoce.

Los flavonoides ya han sido puestos a prueba para tratar la osteoporosis [18]. La soya, una de las plantas con más isoflavonas, tiene una actividad modesta en la salud ósea y debe ser consumida a diario para que genere efectos en el hueso [5]. En cuanto a los derivados sintéticos, actualmente se encuentra en el mercado la ipriflavona, un análogo de isoflavona. En estudios clínicos pequeños aparenta tener actividad mayor a la del placebo; sin embargo, en otro ensayo clínico con

mayor número de pacientes y más años de seguimiento no se demostró mejoría en la densidad mineral ósea comparado con el grupo placebo [46]. Se necesitan de más estudios que expongan si los flavonoides naturales o sintéticos provocan un aumento en la densidad mineral ósea en humanos.

Conclusiones

ISO induce la expresión de marcadores de osteogénesis y aumenta la formación de matriz extracelular en osteoblastos humanos en cultivo, por lo cual es un compuesto potencialmente útil para elaborar nuevos fármacos contra la osteoporosis postmenopáusica. Deben continuarse los estudios sobre ISO para analizar su mecanismo de acción *in vitro*, sus efectos en modelos animales y su eficacia para el tratamiento de la osteoporosis postmenopáusica.

Tabla 1. Oligonucleótidos usados para PCR.

Gen	Acceso	Longitud	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'
GAPDH	NM_000088.3	216 PB	GAAGGTGGTGAAGCAGGCGT	ATGTGGCCATGAGGTCCACCA
COL1A1	NM_001256799.2	148 PB	CCCCTGGAAAGAATGGAGATG	TCCAAACCACTGAAACCTCTG
RUNX2	NM_001015051.3	217 PB	GATCTGAGATTTGTGGGCCGGA	TGGGATGAGGAATGCGCCCTAA
ALPL	NM_000478.4	212 PB	ACCAATGCCCAGGTCCTGACA	GTGGCATGGTTCCTCTCGTGG

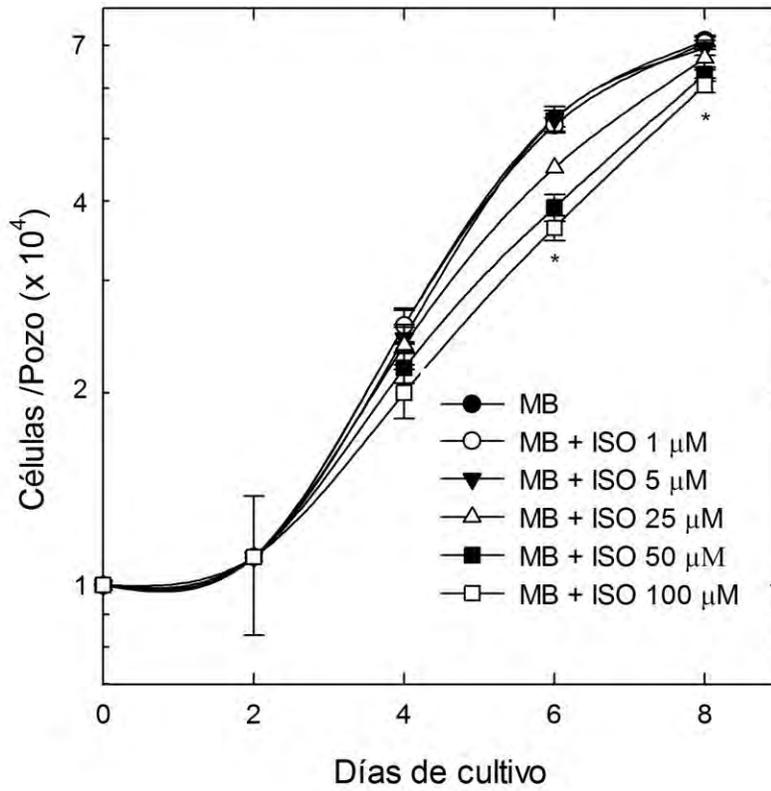


Figura 1. Efecto de ISO sobre la proliferación *in vitro* de osteoblastos humanos.

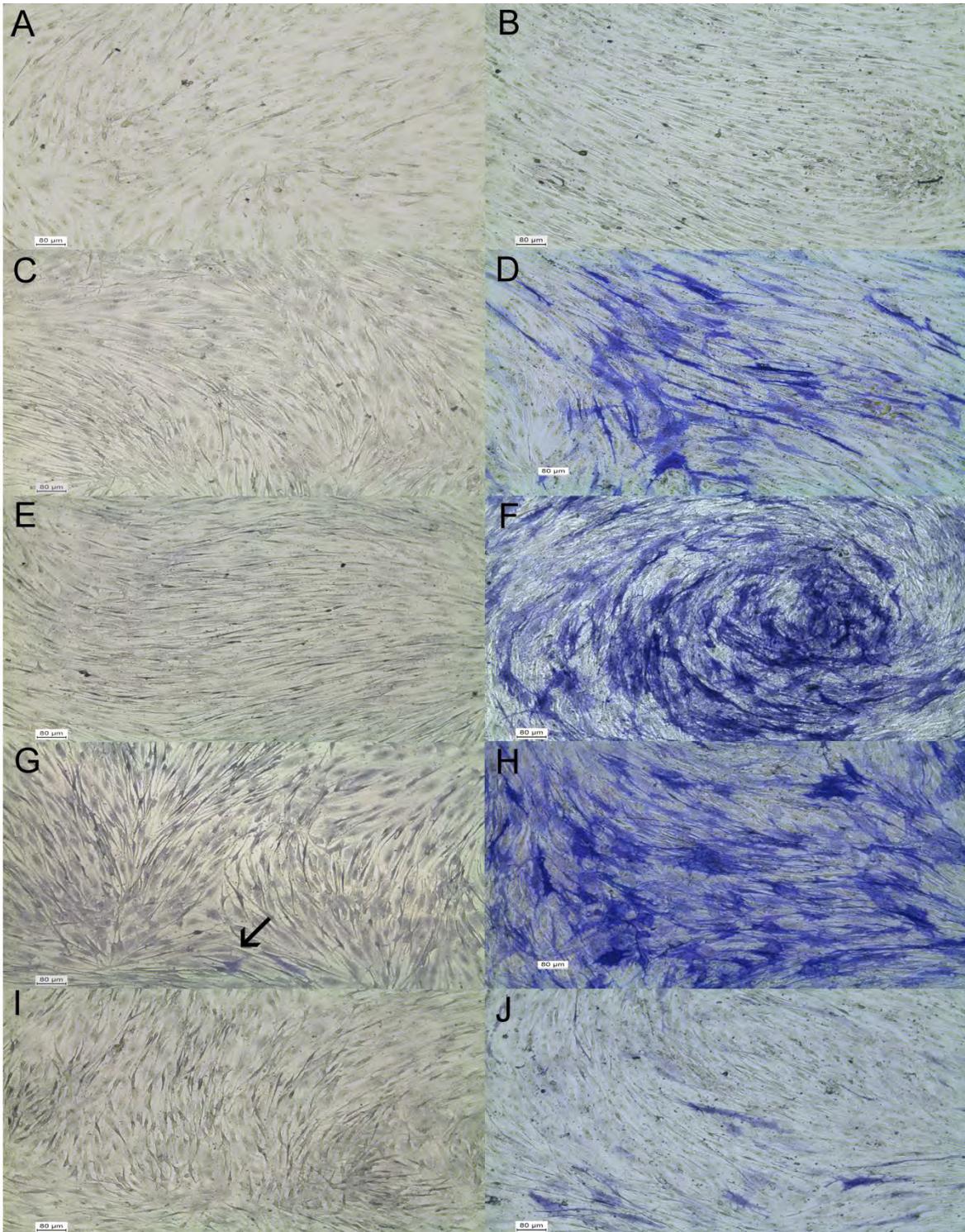


Figura 2. Osteogénesis en cultivos de osteoblastos humanos.

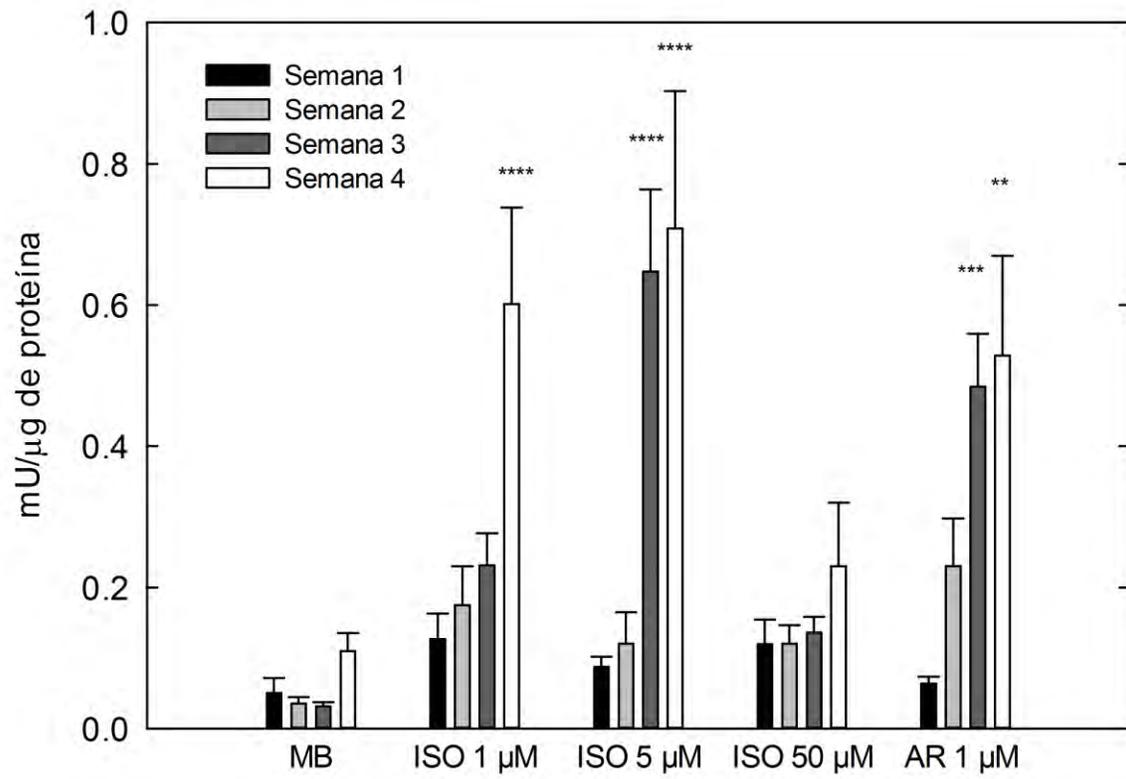


Figura 3. Actividad de fosfatasa alcalina en osteoblastos humanos.

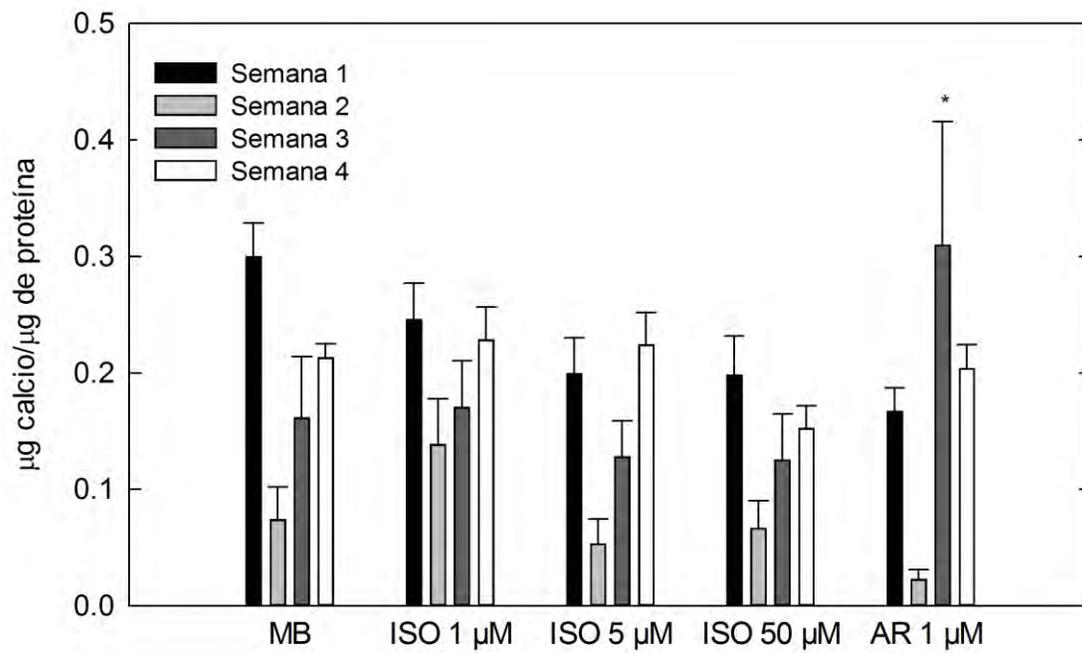


Figura 4. Concentración de calcio en osteoblastos humanos.

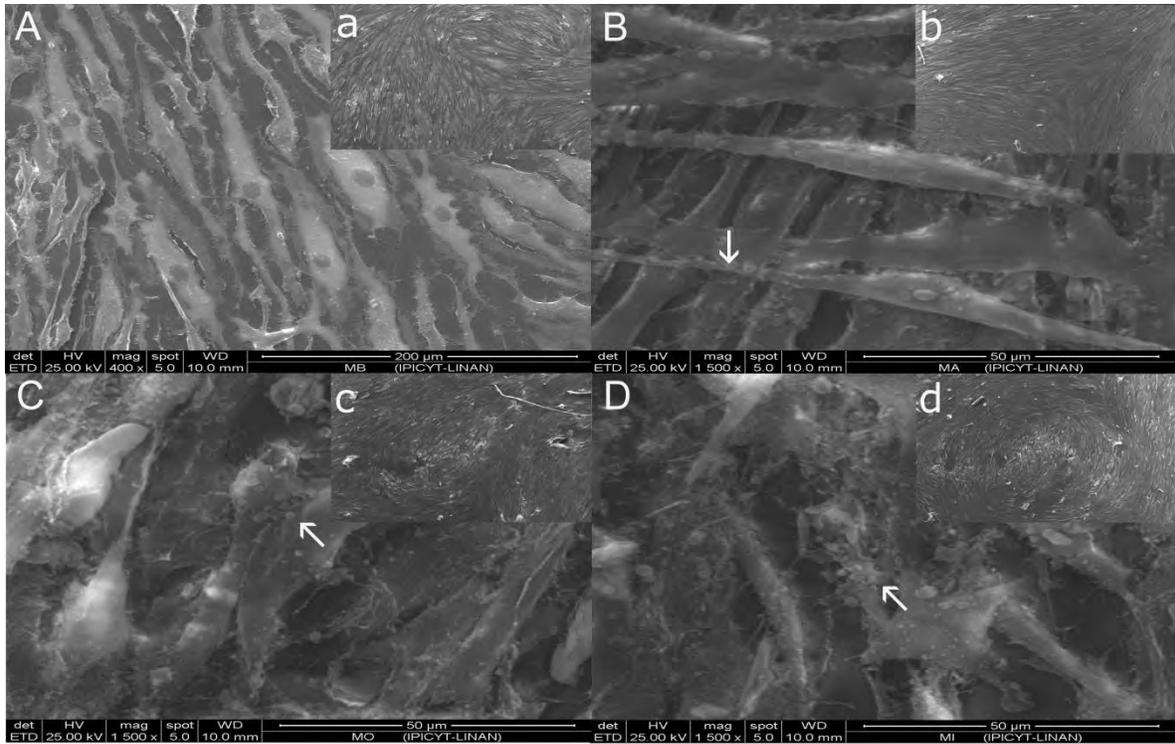


Figura 5. Micrografías de osteoblastos humanos en diferentes condiciones de cultivo por 3 semanas.

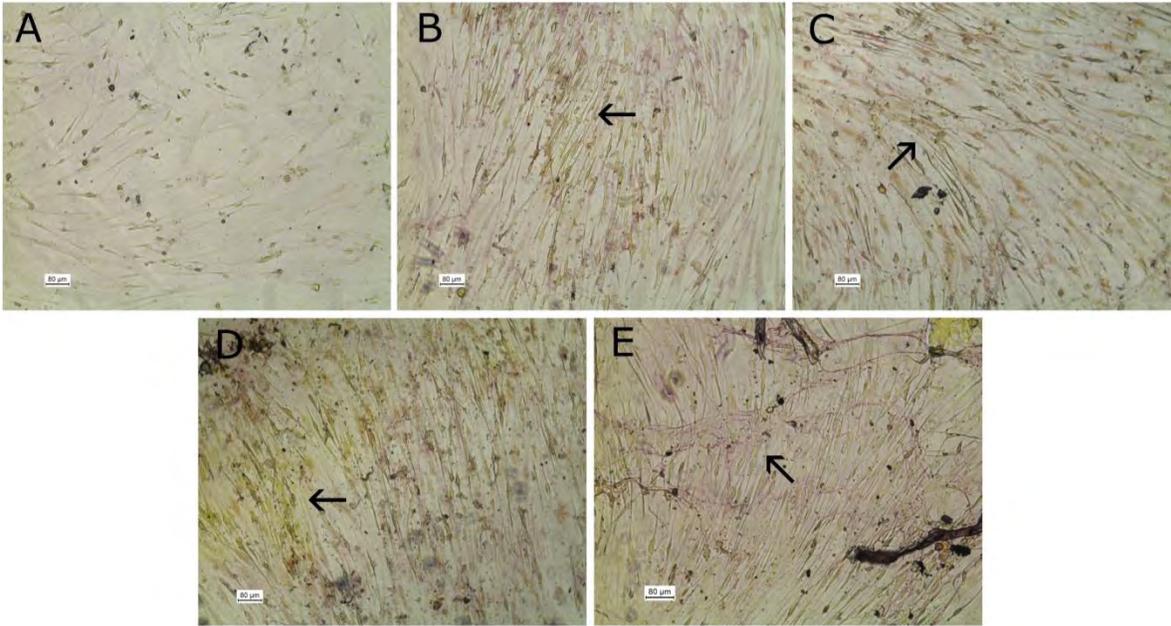


Figura 6. Tinción con Rojo Picrosirio de osteoblastos humanos en cultivo.

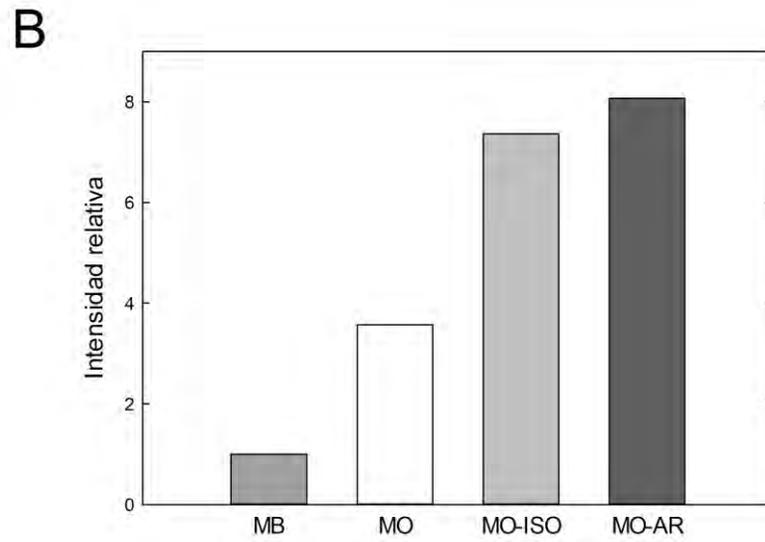
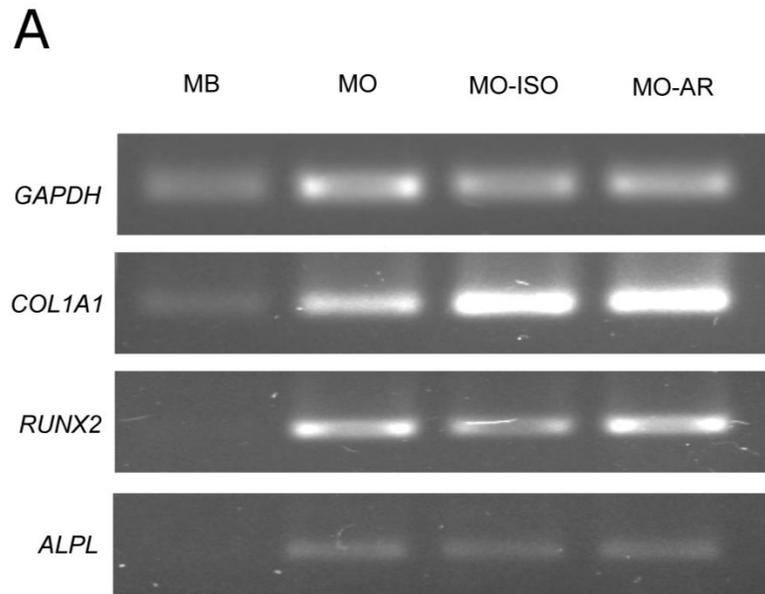


Figura 7. Expresión de genes en osteoblastos humanos.

Pies de las figuras

Fig. 1. Efecto de ISO sobre la proliferación *in vitro* de osteoblastos humanos. Los osteoblastos se sembraron a una densidad de 1×10^4 células/pozo, en placas de 24 pozos con medio basal (MB). Al segundo día del experimento los cultivos se realimentaron con MB suplementado con las concentraciones indicadas de ISO. Los recuentos celulares se realizaron cada dos días usando una cámara de Neubauer. La gráfica representa los resultados de dos experimentos por duplicado \pm SEM. *, Significancia estadística ($p \leq 0.05$).

Fig. 2. Osteogénesis en cultivos de osteoblastos humanos. **(A, B)**, Cultivos confluentes de osteoblastos femorales humanos en medio basal; **(C, D)**, MO-AR; **(E, F)**, MO-ISO $1 \mu\text{M}$; **(G, H)**, MO-ISO $5 \mu\text{M}$; **(I, J)**, MO-ISO $50 \mu\text{M}$. Imágenes con aumento de 10x, la columna de la izquierda representa la primera semana de tratamiento, la columna de la derecha corresponde a la tercera semana de tratamiento.

Fig. 3. Actividad de fosfatasa alcalina en osteoblastos humanos. Los osteoblastos femorales humanos se sembraron a una densidad de 1×10^4 células/pozo en placas de 24 pozos en medio basal. A los siete días del experimento se retiró el medio basal y se agregó el MO-ISO y el MO-AR en las concentraciones mostradas en la gráfica. La actividad de fosfatasa alcalina se midió cada semana después de haber iniciado los tratamientos. La gráfica representa los resultados de dos experimentos por duplicado \pm SEM. **, Significancia estadística ($p \leq 0.01$); ***, ($p \leq 0.001$); ****, ($p \leq 0.0001$).

Fig. 4. Concentración de calcio en osteoblastos humanos. Los osteoblastos femorales humanos se sembraron a una densidad de 1×10^4 células/pozo en placas de 24 pozos. Se utilizaron las mismas condiciones de cultivo del experimento anterior. La concentración de calcio se midió cada semana después de haber iniciado los tratamientos. La gráfica

representa los resultados de dos experimentos por duplicado \pm SEM. *, Significancia estadística ($p \leq 0.05$).

Fig. 5. Micrográficas de osteoblastos humanos en diferentes condiciones de cultivo por 3 semanas. **A:** MB. **B:** MO-AR. **C:** MO. **D:** MO-ISO. **A:** Aumento a 400x. **B-D:** Aumento a 1500x. Imágenes anexas en esquinas superiores derechas (**a-d**) con aumento de 100x. **a:** MB. **b:** MO-AR. **c:** MO. **d:** MO-ISO.

Fig. 6. Tinción con Rojo Picrosirio de osteoblastos humanos en cultivo. **A:** MB por 1 semana. **B:** MB por 3 semanas. **C:** MO por 3 semanas. **D:** MO-ISO por 3 semanas. **E:** MO-AR por 3 semanas. Las imágenes muestran un resultado típico de 2 experimentos independientes. Aumento de 10x.

Fig. 7. Expresión de genes en osteoblastos humanos. **A:** Geles de agarosa con productos de RT-PCR para *GAPDH*, *COL1A1*, *RUNX2* y *ALPL*. Las figuras representan un resultado común en dos experimentos independientes. **B:** Intensidad relativa de banda para *COL1A1* en los distintos tratamientos.

Bibliografía

- [1] E.M. Czekanska, M.J. Stoddart, R.G. Richards, J.S. Hayes, In search of an osteoblast cell model for in vitro research, *Eur. Cells Mater.* 24 (2012) 1–17.
- [2] J. Bonjour, M. Kraenzlin, R. Levasseur, M. Warren, S. Whiting, Dairy in adulthood: from foods to nutrient interactions on bone and skeletal muscle health, *J. Am. Coll. Nutr.* 32 (2013) 251–263.
- [3] M.H. de Mendoza, Clasificación de la osteoporosis: Factores de riesgo. Clínica y diagnóstico diferencial, *An. Sis San Navarra.* 26 (2003) 29–52.
- [4] J. Kular, J. Tickner, S.M. Chim, J. Xu, An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level, *Clin. Biochem.* 45 (2012) 863–873.
- [5] S. Bawa, The significance of soy protein and soy bioactive compounds in the prophylaxis and treatment of osteoporosis, *J. Osteoporos.* 2010 (2010) 891058, 8 pages.
- [6] México: Secretaria de Salud, Guía de Práctica Clínica: Diagnóstico y tratamiento de osteoporosis en el adulto, (2009).
- [7] P. Clark, F. Carlos, J.L. Vázquez Martínez, Epidemiology, costs and burden of osteoporosis in Mexico, *Arch. Osteoporos.* 5 (2010) 9–17.
- [8] P. Clark, P. Lavielle, F. Franco-Marina, E. Ramírez, J. Salmerón, J.A. Kanis, et al., Incidence rates and life-time risk of hip fractures in Mexicans over 50 years of age: A population-based study, *Osteoporos. Int.* 16 (2005) 2025–2030.
- [9] F. Carlos, P. Clark, H. Maciel, J.A. Tamayo, Direct costs of osteoporosis and hip fracture: An analysis for the Mexican social insurance health care

- system, *Salud Publica Mex.* 51, supl. (2009) s108–s113.
- [10] México: Secretaria de Salud, *Diagnostico y tratamiento de osteoporosis en mujeres posmenopausicas*, (2013).
- [11] K. Fujita, M.M. Roforth, S. Demaray, U. McGregor, S. Kirmani, L.K. McCready, et al., Effects of estrogen on bone mRNA levels of sclerostin and other genes relevant to bone metabolism in postmenopausal women, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99 (2014) E81–88.
- [12] K. Kawai, T. Matsuhisa, M. Sakurai, Y. Taniguchi, R. Yatani, Establishment and characterization of a second primary osteosarcoma cell line (OS(rb)/N-M) from a patient cured of bilateral retinoblastoma, *Cancer Lett.* 135 (1998) 37–46.
- [13] X.W. Chen, S.C. Garner, J.J.B. Anderson, Isoflavones regulate interleukin-6 and osteoprotegerin synthesis during osteoblast cell differentiation via an estrogen-receptor-dependent pathway, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295 (2002) 417–422.
- [14] S. Das, J.C. Crockett, Osteoporosis - a current view of pharmacological prevention and treatment, *Drug Des. Devel. Ther.* 7 (2013) 435–448.
- [15] World Health Organization, What evidence is there for the prevention and screening of osteoporosis ?, *J. Am. Med. Assoc.* 285 (2006) 785–795.
- [16] G.J. Crasto, N. Kartner, Y. Yao, K. Li, L. Bullock, A. Datti, et al., Luteolin inhibition of V-ATPase a3-d2 interaction decreases osteoclast resorptive activity, *J. Cell. Biochem.* 114 (2013) 929–941.
- [17] K.C. Middleton E Theoharides TC, The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer,

- Pharmacol. Rev. 52 (2000) 673–751.
- [18] C.-H. Lai, Y.-W. Wu, S.-D. Yeh, Y.-H. Lin, Y.-H. Tsai, C.-H. Lai, et al., Effects of 6-Hydroxyflavone on Osteoblast Differentiation in MC3T3-E1 Cells, Evidence-Based Complement. Altern. Med. 2014 (2014) 1–11.
- [19] G.P. Trueba, Los flavonoides: Antioxidantes o prooxidantes, Rev. Cuba. Investig. Biomed. 22 (2003) 48–57.
- [20] B.H. Koeppen, D.G. Roux, C-glycosylflavonoids. The chemistry of orientin and iso-orientin, Biochem. J. 97 (1965) 444–448.
- [21] E. Küpeli, M. Aslan, I. Gürbüz, E. Yesilada, Evaluation of in vivo biological activity profile of isoorientin, e itschrift r aturforschung. , J. iosci. 59 (2004) 787–790.
- [22] L. Yuan, J. Wang, H. Xiao, W. Wu, Y. Wang, X. Liu, MAPK signaling pathways regulate mitochondrial-mediated apoptosis induced by isoorientin in human hepatoblastoma cancer cells, Food Chem. Toxicol. 53 (2013) 62–68.
- [23] L. Yuan, Y. Wu, X. Ren, Q. Liu, J. Wang, X. Liu, Isoorientin attenuates lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory responses through down-regulation of ROS-related MAPK/NF- κ B signaling pathway in BV-2 microglia, Mol. Cell. Biochem. 386 (2014) 153–165.
- [24] A.J. Alonso-Castro, R. Zapata-Bustos, G. Gómez-Espinoza, L.A. Salazar-Olivo, Isoorientin Reverts TNF- α -Induced Insulin Resistance in Adipocytes Activating the Insulin Signaling Pathway, Endocrinology. 153 (2012) 5222–5230.
- [25] T. Komori, Signaling networks in RUNX2-dependent bone development, J.

- Cell. Biochem. 112 (2011) 750–755.
- [26] T.L. McCarthy, C.B. Kallen, M. Centrella, β -Catenin independent cross-control between the estradiol and Wnt pathways in osteoblasts, *Gene*. 479 (2011) 16–28.
- [27] I. Titorencu, V. Pruna, V. V. Jinga, M. Simionescu, Osteoblast ontogeny and implications for bone pathology: An overview, *Cell Tissue Res*. 355 (2014) 23–33.
- [28] L.F. Bonewald, The amazing osteocyte, *J. Bone Miner. Res*. 26 (2011) 229–238.
- [29] C. Bruedigam, M. van Driel, M. Koedam, J. van de Peppel, B.C.J. van der Eerden, M. Eijken, et al., Basic techniques in human mesenchymal stem cell cultures: Differentiation into osteogenic and adipogenic lineages, genetic perturbations, and phenotypic analyses, in: *Curr. Protoc. Stem Cell Biol.*, 2011: pp. 1–20.
- [30] M.J. Coelho, M.H. Fernandes, Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation, *Biomaterials*. 21 (2000) 1095–1102.
- [31] N. Ogston, A.J. Harrison, H.F.J. Cheung, B.A. Ashton, G. Hampson, Dexamethasone and retinoic acid differentially regulate growth and differentiation in an immortalised human clonal bone marrow stromal cell line with osteoblastic characteristics, *Steroids*. 67 (2002) 895–906.
- [32] L. Yang, Q. Chen, F. Wang, G. Zhang, Antiosteoporotic compounds from seeds of *Cuscuta chinensis*, *J. Ethnopharmacol*. 135 (2011) 553–560.

- [33] S.M. Jackson, L.L. Demer, Peroxisome proliferator-activated receptor activators modulate the osteoblastic maturation of MC3T3-E1 preosteoblasts, *FEBS Lett.* 471 (2000) 119–124.
- [34] T. Bradford, Quantitation of proteins, *Mol. Biol.* (2000) 1–10.
- [35] K. Hisada, K. Hata, F. Ichida, T. Matsubara, H. Orimo, T. Nakano, et al., Retinoic acid regulates commitment of undifferentiated mesenchymal stem cells into osteoblasts and adipocytes, *J. Bone Miner. Metab.* 31 (2013) 53–63.
- [36] F.H. Pollard, J. V Martin, The spectrophotometric determination of the alkaline-earth metals with murexide, eriochrome black T and with o-cresolphthalein complexone, *Analyst.* 81 (1956) 348–353.
- [37] A. Jacobson, S. Johansson, M. Branting, H. Melhus, Vitamin A differentially regulates RANKL and OPG expression in human osteoblasts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322 (2004) 162–167.
- [38] A. Pham, C. Nguyen, K. Malterud, D. Diallo, H. Wangensteen, Bioactive Flavone-C-Glycosides of the African Medicinal Plant *Biophytum Umbraculum*, *Molecules.* 18 (2013) 10312–10319.
- [39] R. Orrego, E. Leiva, J. Cheel, Inhibitory Effect of Three C-glycosylflavonoids from *Cymbopogon citratus* (Lemongrass) on Human Low Density Lipoprotein Oxidation, *Molecules.* 14 (2009) 3906–3913.
- [40] L.A. Nash, P.J. Sullivan, S.J. Peters, W.E. Ward, Rooibos flavonoids, orientin and luteolin, stimulate mineralization in human osteoblasts through the Wnt pathway, *Mol. Nutr. Food Res.* 59 (2015) 443–453.
- [41] P. Singh, S. Sharma, S. Kumar Rath, Genistein induces deleterious effects

during its acute exposure in Swiss mice, *Biomed Res. Int.* 2014 (2014) 14 pages.

- [42] S.F. Williams, S.E. Meek, T.J. Moraghan, Spurious hypocalcemia after gadodiamide administration, *Mayo Clin. Proc.* 80 (2005) 1655–1657.
- [43] H. Tullberg-Reinert, G. Jundt, In situ measurement of collagen synthesis by human bone cells with a sirius red-based colorimetric microassay: effects of transforming growth factor beta 2 and ascorbic acid 2-phosphate, *Histochem. Cell Biol.* 112 (1999) 271–276.
- [44] E.M. Choi, Modulatory effects of luteolin on osteoblastic function and inflammatory mediators in osteoblastic MC3T3-E1 cells, *Cell Biol. Int.* 31 (2007) 870–877.
- [45] D. Mattinzoli, P. Messa, A. Corbelli, M. Ikehata, C. Zennaro, S. Armelloni, et al., A novel model of in vitro osteocytogenesis induced by retinoic acid treatment., *Eur. Cell. Mater.* 24 (2012) 403–425.
- [46] P. Alexandersen, A. Toussaint, C. Christiansen, J.-P. Devogelaer, C. Roux, J. Fechtenbaum, et al., Ipriflavone in the treatment of postmenopausal osteoporosis: A randomized controlled trial, *J. Am. Med. Assoc.* 285 (2001) 1482–1488.