

**Departamento de Medicina
Facultad de Medicina
UNIVERSITAT AUTÓNOMA DE BARCELONA**

**CULTIVO PRIMARIO PARA EL
ESTUDIO DE LA FUNCIÓN
OSTEOBLÁSTICA**

**Sílvia Ruiz Gaspà
2005**

Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Medicina

Departament de Medicina

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral con el título: **”Cultivo primario para el estudio de la función osteoblástica”** presentada por la Lda. Sílvia Ruiz Gaspà y realizada en el Institut Municipal de Investigacions Mèdiques (IMIM), bajo la dirección del Dr. Adolfo Díez Pérez y el Dr. Xavier Nogués Solán del Departamento de Medicina Interna del Hospital del Mar de Barcelona, reúne los requisitos necesarios para ser presentada en el tribunal correspondiente para optar al grado de Doctor por la Universitat Autònoma de barcelona

Prof. Adolfo Díez Pérez

Prof. Xavier Nogués Solán

Sílvia RuizGaspà

Barcelona, setiembre de 2005

**Existe al menos un rincón del universo que con toda
seguridad puedes mejorar, y eres tú mismo.**

(Aldous Huxley)

Al Toni

Als meus pares

A la Gemma i el Carles

A l'Elena, El Antonio, la Cutu y el Txitxo

Agradecimientos:

En primer lloc vull agrair de manera molt especial als meus directors de tesi per donar-me la oportunitat de realitzar aquesta tesi, pels bons consells, els ànims i sobretot l'afecte que m'han demostrat aquests quatre anys i de manera molt especial en la recta final de la tesi.

Durant tot aquest temps des que vaig començar la tesi he tingut la sort d'estar envoltada de persones que han fet que aquest treball fos possible, gràcies a tot el que m'han ensenyat, les estones que hem compartit i l'amistat que ha quedat. A tots moltes gràcies.

Faig una menció especial al Toni, per mostrar-se sempre tan il·lusionat i incondicional amb el meu treball... no ha deixat que mai defallís! T'estimo

En darrer lloc m'agradaria donar les gràcies a tota la meva família i amics, però en especial als meus pares per estar al meu costat des de sempre i per sempre...

Índice

I. ABREVIATURAS

II. INTRODUCCIÓN	1-42
1. EL TEJIDO ÓSEO	1-3
2. CONSTITUYENTES DEL TEJIDO ÓSEO	4-10
2.1 LA MATRIZ ÓSEA	4-5
2.1.1 Matriz orgánica	4
2.1.1.1 Colágeno	4
2.1.1.2 Osteocalcina	4
2.1.2 Matriz inorgánica	5
2.2 LAS CÉLULAS ÓSEAS	5-10
2.2.1 Osteoblastos	6-7
2.2.2 Osteoclastos	7-8
2.2.3 Osteocitos	9-10
2.2.4 Células de revestimiento	10
3. CRECIMIENTO Y MODELADO ÓSEO	11
3.1 OSIFICACIÓN INTERMEMBRANOSA	11
3.2 OSIFICACIÓN ENDOCONDAL	11
4. REMODELADO ÓSEO	12-2
4.1 ETAPAS DEL REMODELADO ÓSEO	12-13
4.2 REGULACIÓN DEL REMODELADO ÓSEO	13-22
4.2.1 Regulación sistémica del remodelado óseo	17
4.2.2 Regulación local del remodelado óseo	18-22

5. OSTEOPOROSIS	23-33
5.1 DEFINICIÓN	23-24
5.2 CLASIFICACIÓN DE LA OSTEOPOROSIS	24-27
5.2.1 Osteoporosis masculina	25-26
5.2.2 Osteoporosis posmenopáusica	26-27
5.3 EPIDEMIOLOGÍA	27
5.4 CAUSAS DE LA OSTEOPOROSIS	27-30
5.4.1 Factores genéticos	27
5.4.2 Nutrición y ejercicio	27
5.4.3 Hormonas sistémicas	28
5.4.4 Factores locales	29
5.5 DIAGNÓSTICO	30-32
5.6 TRATAMIENTO DE LA OSTEOPOROSIS	32-33
5.6.1 Tratamiento no farmacológico	32
5.6.2 Tratamiento farmacológico	33
6. ESTATINAS EN EL REMODELADO OSEO	34-38
6.1 NATURALEZA QUÍMICA DE LAS ESTATINAS	34
6.2 FARMACOLOGÍA	35
6.3 MECANISMO DE ACTUACIÓN DE LAS ESTATINAS	35-36
6.4 MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS ESTATINAS EN EL HUESO	36-38
7. CULTIVOS CELULARES	39-41
7.1. GENERALIDADES DEL CULTIVO CELULAR	39

7.2 CULTIVO DE OSTEÓBLASTOS -----	40-41
7.2.1 Cultivo primario -----	40
7.2.2 Líneas celulares inmortalizadas derivadas de tumores -----	40-41
7.2.3 Líneas celulares clonadas -----	41
III. OBJETIVOS -----	43-44
IV. PACIENTES Y MÉTODOS -----	45-64
1. PACIENTES -----	45-46
1.1 PACIENTES SUBESTUDIO II-----	45
1.1.1 Criterios de inclusión -----	45
1.1.2 Criterios de exclusión -----	45
1.1.3 Sujetos de estudio -----	45
1.2 PACIENTES SUBESTUDIO III-----	46
1.1.1 Línea celular MG-63 -----	46
1.2.2 “pool” de células osteoblásticas primarias -----	46
1.3 PACIENTES SUBESTUDIO IV -----	46
1.3.1 Criterios de inclusión -----	46
1.3.2 Criterios de exclusión -----	46
1.3.3 Sujetos de estudio -----	46
2. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS -----	47
2.1 PRÓTESIS DE RODILLA Y CADERA -----	47
2.2 BIOPSIA DE CRESTA ILÍACA-----	47

3. CULTIVO CELULAR	48
3.1 CULTIVO PRIMARIO DE OSTEÓBLASTOS	48-49
3.2 CULTIVO DE LA LÍNEA MG-63	49
3.3 CULTIVO PRIMARIO DE FIBROBLASTOS	49
3.4 CONTAJE CELULAR	50
3.5 CRIOPRESERVACIÓN CELULAR	50
3.6 DESCONGELACIÓN DE CÉLULAS	50
4. CARACTERIZACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES	51-53
4.1 MORFOLOGÍA CELULAR	51
4.2 HISTOQUÍMICA PARA LA DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD 51	
FOSFATASA ALCALINA	51
4.3 DETECCIÓN CUALITATIVA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA 52	
DE OSTEOCALCINA	52-53
4.3.1 Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario (ADNc)	53
4.3.2 PCR Osteocalcina (BGP)	53
5. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE LA TINCIÓN CON	
TRYPAN BLUE	53
6 CURVAS DE PROLIFERACIÓN CELULAR	54
7. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN MEDIANTE ELISA DEL BrdU	54-55
8. TEST DE VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE ELISA DEL MTT	55
9. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE OPG, RANKL, COL1A1, BGP, Cbfa1	
Y BMP-2	56-61
9.1 TRATAMIENTO	56

9.1.1 subestudio II -----	56
9.1.2 subestudio III -----	56
9.1.3 subestudio IV -----	56
9.2 EXTRACCIÓN DE ARN Y SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO (ADNc) -----	57
9.3 PCR CUANTITATIVA (<i>Real Time PCR</i>) -----	57-61
10. DENSIDAD MINERAL ÓSEA -----	62
11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO-----	63
V. SUBESTUDIO I -----	65-76
1. CULTIVO DE OSTEOLASTOS HUMANOS-----	65-76
VI. SUBESTUDIO II -----	77-102
1. RESULTADOS-----	79-96
1.1 PACIENTES SELECCIONADAS-----	79
1.2 PROLIFERACIÓN CELULAR RN OSTEOLASTOS PRIMARIOS DE PACIENTES MENOPÁUSICAS OSTEOPORÓTICAS Y NO OSTEOPORÓTICAS-----	80-84
1.3 EXPRESIÓN GÉNICA DE LA OPG, RANKL, POLIPÉPTIDO α 1 DEL COLÁGENO TIPO 1 (COL1A1), Cbfa1 Y BMP-2 EN OSTEOLASTOS PRIMARIOS DE PACIENTES MENOPÁUSICAS OSTEOPORÓTICAS Y NO OSTEOPORÓTICAS-----	85-96
1.3.1 Expresión génica de la OPG en osteoblastos primarios de pacientes menopáusicas osteoporóticas y no osteoporóticas-----	86-88
1.3.1.1 Detección de la expresión génica de OPG en osteoblastos primarios procedentes de mujeres menopáusicas osteoporóticas y no osteoporóticas-----	86-87
1.3.1.2 Cuantificación de la expresión génica de la OPG en osteoblastos primarios procedentes de mujeres menopáusicas osteoporóticas y no osteoporóticas-----	87

1.3.1.3	Efecto de la vitamina D y el 17 β -estradiol sobre la expresión génica de la OPG en osteoblastos primarios de pacientes menopáusicas osteoporóticas y no osteoporóticas-----	88
1.3.2	Expresión génica del RANKL en osteoblastos primarios de pacientes menopáusicas osteoporóticas y no osteoporóticas-----	89-91
1.3.2.1	Detección de la expresión génica de RANKL en osteoblastos primarios procedentes de mujeres menopáusicas osteoporóticas y no osteoporóticas--	89
1.3.2.2	Cuantificación de la expresión génica de la RANKL en osteoblastos primarios procedentes de mujeres menopáusicas osteoporóticas y no osteoporóticas-----	89-90
1.3.2.3	Efecto de la vitamina D y el 17 β -estradiol sobre la expresión génica de la RANKL en osteoblastos primarios de pacientes menopáusicas osteoporóticas y no osteoporóticas-----	90-91
1.3.3	Expresión génica del COL1A1 en osteoblastos primarios de pacientes menopáusicas osteoporóticas y no osteoporóticas-----	91-92
1.3.3.1	Detección de la expresión génica de COL1A1 en osteoblastos primarios procedentes de mujeres menopáusicas osteoporóticas y no osteoporóticas--	91
1.3.3.2	Cuantificación de la expresión génica de la COL1A1 en osteoblastos primarios procedentes de mujeres menopáusicas osteoporóticas y no osteoporóticas-----	92
1.3.4	Expresión génica de la osteocalcina en osteoblastos primarios de pacientes menopáusicas osteoporóticas y no osteoporóticas-----	92-93
1.3.4.1	Detección de la expresión génica de la osteocalcina en osteoblastos primarios procedentes de mujeres menopáusicas osteoporóticas y no osteoporóticas-----	92-93
1.3.4.2	Cuantificación de la expresión génica de la OPG en osteoblastos primarios procedentes de mujeres menopáusicas osteoporóticas y no	

osteoporóticas-----	93
1.3.5 Expresión génica del Cbfa1 en osteoblastos primarios de pacientes	
menopáusicas osteoporóticas y no osteoporóticas-----	94-95
1.3.5.1 Detección de la expresión génica de Cbfa1 en osteoblastos primarios procedentes de mujeres menopáusicas osteoporóticas y no osteoporóticas-----	94
1.3.5.2 Cuantificación de la expresión génica de la Cbfa1 en osteoblastos primarios procedentes de mujeres menopáusicas osteoporóticas y no osteoporóticas-----	95
1.3.6 Expresión génica de la BMP-2 en osteoblastos primarios de pacientes	
menopáusicas osteoporóticas y no osteoporóticas-----	95-96
1.3.6.1 Detección de la expresión génica de la BMP-2 en osteoblastos primarios procedentes de mujeres menopáusicas osteoporóticas y no osteoporóticas-----	95
1.3.6.2 Cuantificación de la expresión génica de la BMP-2 en osteoblastos primarios procedentes de mujeres menopáusicas osteoporóticas y no osteoporóticas-----	96
2. DISCUSIÓN-----	97-102
2.1 PROLIFERACIÓN OSTEABLÁSTICA-----	98-99
2.2 EXPRESIÓN GÉNICA DE LA OPG Y RANKL-----	99-100
2.3 EFECTO DE LA VITAMINA D Y EL 17β-ESTRADIOL SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LA OPG Y EL RANKL-----	100-102
2.4 EXPRESIÓN GÉNICA DEL POLIPÉPTIDO α1 DEL COLÁGENO TIPO I Y LA OSTEOCALCINA-----	102
2.5 EXPRESIÓN GÉNICA DEL Cbfa1 Y BMP-2-----	102
VII. SUBESTUDIO III -----	103-136

1. RESULTADOS-----	105-126
1.1 SUJETOS DE ESTUDIO-----	105
1.1.1 Línea celular MG-63-----	105
1.1.2 Osteoblastos primarios humanos normales-----	105
1.2 TOXICIDAD DE LA SIMVASTATINA Y ATORVASTATINA SOBRE LOS OSTEOBLASTOS PRIMARIOS HUMANOS NORMALES Y LAS MG-63-----	105
1.3 EFECTO DE LA SIMVASTATINA Y LA ATORVASTATINA SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN OSTEOBLASTOS PRIMARIOS HUMANOS NORMALES Y LAS MG-63-----	106-110
1.4 EFECTO DE LA SIMVASTATINA Y LA ATORVASTATINA SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DEL POLIPÉPTIDO α1 DEL COLÁGENO TIPO 1 (COL1A1) EN OSTEOBLASTOS PRIMARIOS HUMANOS NORMALES Y LAS MG-63-----	111-114
1.5 EFECTO DE LA SIMVASTATINA Y LA ATORVASTATINA SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LA OSTEOCALCINA EN OSTEOBLASTOS PRIMARIOS HUMANOS NORMALES Y LAS MG-63-----	115-118
1.6 EFECTO DE LA SIMVASTATINA Y LA ATORVASTATINA SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA LA <i>BONE MORPHOGENETIC PROTEIN-2</i> (BMP-2) EN OSTEOBLASTOS PRIMARIOS HUMANOS NORMALES Y LAS MG-63-----	119-122
1.7 EFECTO DE LA SIMVASTATINA Y LA ATORVASTATINA SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR A LO LARGO DEL TIEMPO EN OSTEOBLASTOS PRIMARIOS HUMANOS NORMALES Y LAS MG-63-----	123-126
2. DISCUSIÓN-----	127-136
2.1 TOXICIDAD DE LAS ESTATINAS SOBRE LOS OSTEOBLASTOS HUMANOS--	129-130
2.2 EFECTO DE LA SIMVASTATINA Y LA ATORVASTATINA SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR-----	130-132
2.3 EFECTO DE LA SIMVASTATINA Y LA ATORVASTATINA SOBRE LA EXPRESIÓN	

GÉNICA DEL POLIPÉPTIDO α 1 DEL COLÁGENO TIPO 1 (COL1A1), OSTEOCALCINA Y BMP-2 EN OSTEOLASTOS PRIMARIOS HUMANOS NORMALES Y LAS MG-63---	132-134
2.4 EFECTO DE LAS ESTATINAS SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR A LO LARGO DEL TIEMPO-----	134-136
VIII. SUBESTUDIO IV -----	137-153
1. RESULTADOS -----	139-146
1.1 PACIENTES SELECCIÓN-----	139
1.2 BIÓPSIA CRESTA ILÍACA-----	139
1.3 PROLIFERACIÓN CELULAR EN OSTEOLASTOS PRIMARIOS DE VARONES OSTEOPORÓTICOS Y CONTROLES SANOS-----	139-144
1.4 EXPRESIÓN GÉNICA DEL POLIPÉPTIDO α 1 DEL COLÁGENO TIPO 1 Y OSTEOCALCINA EN OSTEOLASTOS PRIMARIOS DE VARONES OSTEOPORÓTICOS Y CONTROLES SANOS-----	145-146
1.4.1 Expresión génica del COL1A1 en osteoblastos primarios de varones osteoporóticos y controles sanos-----	146
1.4.2 Expresión génica de la osteocalcina en osteoblastos primarios de varones osteoporóticos y controles sanos-----	146
2. DISCUSIÓN -----	147-150
2.1 PROLIFERACIÓN CELULAR-----	148-149
2.3 EXPRESIÓN GÉNICA DEL POLIPÉPTIDO α 1 DEL COLÁGENO TIPO 1 Y LA OSTEOCALCINA-----	150
IX. CONCLUSIONES -----	151-154
X. BIBLIOGRAFÍA -----	155-170

I. Abreviaturas

ABREVIATURAS**1.25 dihidroxivitamina D₃:** Vitamina D₃

ARN:	Ácido ribonucleico
ATCC:	<i>American type culture collection</i>
BMP:	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BMU:	<i>Basic multicelular units</i>
BrEt:	Bromuro de etidio
BSA:	Seroalbúmina bovina
CFU-GM:	Células formadoras de granulocitos y macrófagos
COL1A1:	Polipéptido α 1 del colágeno tipo 1
DMEM:	<i>Dulbecco's modified médium</i>
DMO:	Densidad mineral ósea
DMSO:	Dimetilsulfóxido
FBS/FCS:	Suero de ternera fetal
FGF:	<i>Fibroblast growth factor</i>
GM-CSF:	<i>Granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
HG:	Hormona del crecimiento
HMG-CoA:	Enzima betaHidroxi- betaMetilGlutaril-Coenzima A
IFF:	Factor de crecimiento de la insulina
IFN:	Interferón
IGF:	<i>Insulin-like growth factor</i>
IL-1:	Interleucina 1
IL-11:	Interleucina 11
IL-13:	Interleucina 13

IL-18:	Interleucina 18
IL-1-R1:	Receptor 1 de la interleucina 1
IL-1-R2:	Receptor señuelo de la interleucina 1
IL-4:	Interleucina 4
IL-6:	Interleucina 6
M-CSF:	<i>Macrophage colony stimulating factor</i>
MSC:	Célula progenitora de origen mesenquimal
ODF/RANKL:	Factor de diferenciación osteoclástica o ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B
OMI:	Osteoporosis masculina idiopática o primaria
OMS:	Organización mundial de la salud
OPG:	Osteoprotegerina
PBS:	Tampón fosfato
PDGF:	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PG:	Prostaglandinas
PTH:	Hormona paratiroidea
PTHrP:	Receptor tipo 1 de la hormona paratiroidea
RANK:	Receptor activador del factor nuclear kappa B
Runx-2/Cbfa1:	Factor de transcripción relacionado con Runt-2
TGFβ:	<i>Transforming growth factor beta</i>
TNF:	<i>Tumor necrosis factor</i>
TRAP:	Enzima fosfatasa ácida resistente al tartrato

II. Introducción

1. EL TEJIDO ÓSEO

El hueso es un tejido conectivo especializado que juntamente con el cartílago forma el sistema esquelético. Tiene tres funciones principales: mecánica (soporta el cuerpo y es zona de unión de la musculatura); protectora (de los órganos vitales y la médula ósea); y metabólica (como reserva de iones, especialmente calcio y fosfato) [Baron, 2003].

Desde un punto de vista anatómico, en el esqueleto se pueden distinguir dos tipos de hueso: los huesos planos (como los huesos craneales, la escápula, la mandíbula, el ilion, etc...) y los huesos largos (como la tibia, el fémur, el húmero, etc...).

A nivel microscópico, el hueso largo está formado por tres partes diferenciadas (Figura 1): dos extremos anchos (epífisis), en el medio un tubo más o menos cilíndrico (diáfisis) y la zona intermedia entre estas dos partes (metáfisis) que es la que se encuentra en continuo desarrollo. La epífisis y la metáfisis se originan a partir de dos centros de osificación independientes y durante el crecimiento están separadas por una capa de cartílago llamada cartílago epifisiario o plataforma de crecimiento que realiza el proceso de calcificación.

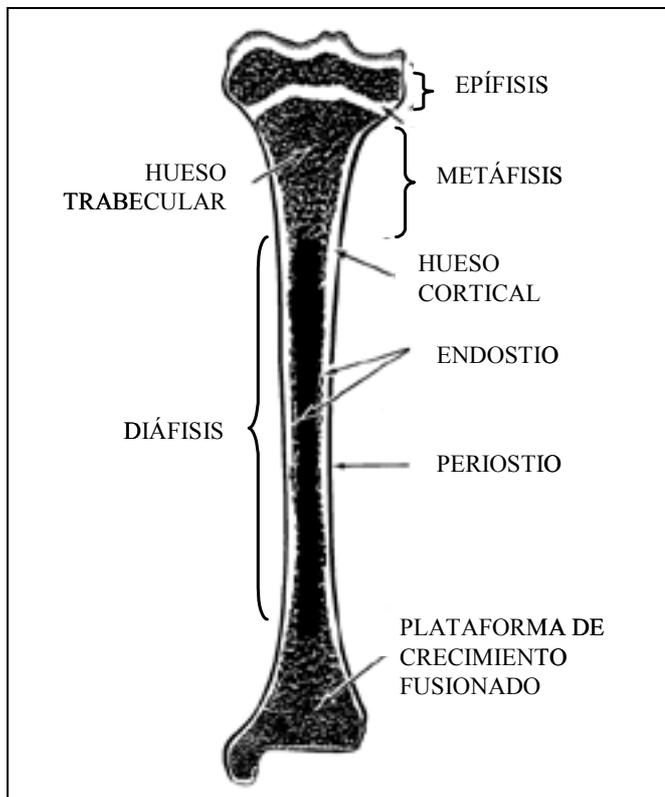


Figura 1: Esquema de una sección longitudinal del hueso largo en fase de crecimiento [Baron, 2003].

En el análisis histológico del esqueleto del individuo adulto (Figura 2) se observa que está formado por hueso cortical o compacto que es el principal responsable de la integridad mecánica (80% del volumen total del hueso) y por hueso trabecular o esponjoso que es el responsable fundamental de las demandas metabólicas (20% del volumen total del hueso). El hueso cortical constituye la mayor parte de la diáfisis de los huesos largos así como de la parte externa de todos los huesos del cuerpo. Tiene una estructura de láminas o anillos concéntricos alrededor de canales centrales llamados canales de Havers que se extienden longitudinalmente. Los canales de Havers están conectados entre sí por otros canales llamados canales de Volkmann que perforan el periostio. Ambos canales son utilizados por los vasos sanguíneos, linfáticos y nervios para extenderse por el hueso. Entre las láminas concéntricas de matriz mineralizada hay pequeños orificios o lagunas donde se encuentran los osteocitos. Estas células intercambian nutrientes con el líquido intersticial a través de una serie de canalículos por donde se extienden prolongaciones celulares citoplasmáticas. Los canalículos están conectados entre sí y, eventualmente a los canales de Havers. El canal de Havers junto con las láminas concéntricas que lo rodean, las lagunas, los canalículos y los osteocitos recibe el nombre de osteona o sistema de Havers. Las restantes láminas entre osteona se llaman láminas intersticiales.

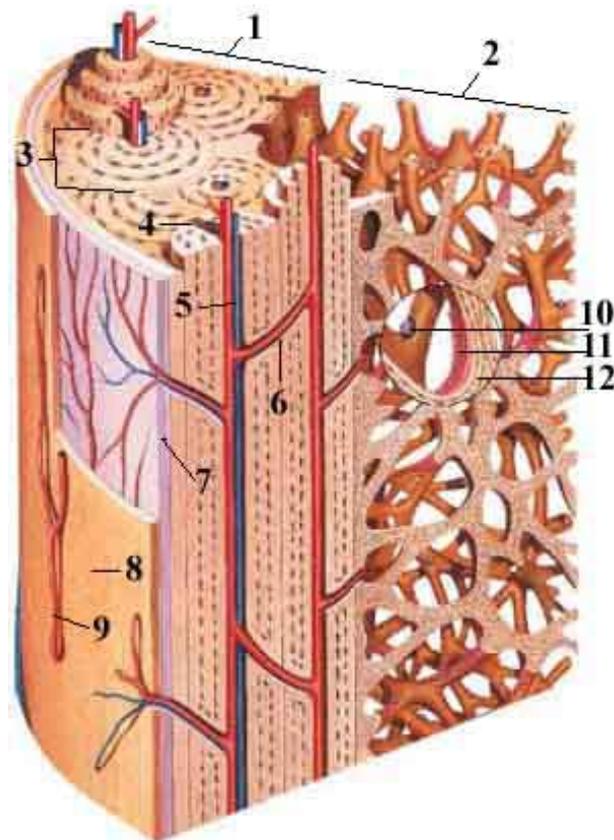


Figura 2: Esquema morfológico de la estructura ósea: hueso cortical y hueso trabecular. 1: Hueso cortical. 2: Hueso trabecular. 3: Sistema de Havers 4: Vaso sanguíneo. 5: Canal de Havers. 6: Canal de Volkmann. 7: Periostio. 8: Revestimiento óseo. 9: Vasos del periostio. 10: Osteoclastos. 11: Osteoblastos. 12: Osteocitos.

[<http://www.zonamedica.com.ar/categorias/medicinailustrada/osteoporosis/estructura.htm>]

A diferencia del hueso compacto, el hueso trabecular no contiene osteonas, sino que las láminas intersticiales están dispuestas de forma irregular formando unos tabiques o placas llamadas trabéculas. Estos tabiques forman una estructura esponjosa dejando huecos que están llenos de la médula ósea roja. Dentro de las trabéculas están los osteocitos que yacen en sus lagunas con canalículos que irradian desde las mismas. En este caso, los vasos sanguíneos penetran directamente en el hueso esponjoso y permiten el intercambio de nutrientes con los osteocitos. El hueso esponjoso es el principal constituyente de las epífisis de los huesos largos y del interior de la mayor parte de los huesos planos. En la superficie de las trabéculas se encuentran dos tipos celulares encargados del mantenimiento del tejido óseo. Por un lado tenemos los osteoblastos (precursores de los osteocitos) que son las células encargadas de la síntesis y deposición de la matriz ósea y su posterior mineralización y por otro lado los osteoclastos que son los encargados de la destrucción de las superficies óseas para la posterior reposición de matriz nueva.

2. CONSTITUYENTES DEL TEJIDO ÓSEO

2.1 LA MATRIZ ÓSEA

La matriz del tejido óseo tiene la peculiaridad de que se encuentra mineralizada. Esta matriz es metabólicamente activa y se halla formada por una fase mineral y una fase orgánica (un 65% material cristalino inorgánico y un 35% matriz orgánica). La fase orgánica está formada por fibras de colágeno tipo 1 orientadas en una dirección preferencial (90% de la proteína total), por proteínas no estructurales de menor tamaño (osteocalcina, osteonectina, fosfoproteínas, sialoproteínas, factores de crecimiento, proteínas séricas, etc.), y por glicosaminoglicanos y lípidos. La fase mineral está formada por iones de fosfato cálcico depositados en forma de cristales de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) entre las fibras de colágeno [Baron., 2003].

La matriz ósea es la responsable de las propiedades biomecánicas del hueso. Las fibras de colágeno proporcionan flexibilidad y resistencia a la tensión mientras que las sales minerales confieren dureza, rigidez y resistencia a la compresión.

2.1.1 La matriz orgánica

2.1.1.1 Colágeno: El colágeno tipo 1 es la molécula que forma la estructura básica de la red de fibras de la matriz ósea. Se trata de una molécula formada por dos cadenas $\alpha 1$ estructuralmente iguales pero genéticamente distintas y una cadena $\alpha 2$ [Robey y Boskey, 2003]. El colágeno tipo 1 es sintetizado por los osteoblastos, odontoblastos y fibroblastos [Rossert y col., 2000] y es secretado como procolágeno que es la molécula precursora caracterizada por la presencia de extensiones peptídicas amino y carboxiterminales. Antes de que las moléculas de colágeno se unan para formar la triple hélice, las dos regiones terminales sufren una reacción proteolítica provocando su liberación [Tohemé y col., 1991].

2.1.1.2 Osteocalcina: La osteocalcina, también llamada *bone Gla-protein* (BGP) es una pequeña proteína de 49 aminoácidos, específica del tejido óseo y la dentina, que constituye el 20% de las proteínas no colágenas presentes en la matriz ósea. Se caracteriza por la presencia de un aminoácido derivado de una modificación postraduccional, vitamina K dependiente, del ácido glutámico, llamado *gamma-carboxyglutamic acid* (gla). La biosíntesis de la osteocalcina es dependiente de la vitamina K y es estimulada por la presencia de vitamina D. En presencia de concentraciones fisiológicas de calcio, los residuos gla proporcionan un cambio conformacional a la molécula que promueve la unión de la osteocalcina con la hidroxiapatita favoreciéndose la formación ósea y su posterior mineralización [Gundberg, 1992]. La osteocalcina sintetizada se queda mayoritariamente incorporada a la matriz ósea debido a su capacidad de unión al calcio y a la hidroxipatita, pero una fracción de esta es liberada a la sangre siendo su determinación bioquímica un buen indicador de índice de formación ósea [Garnero, 1994].

2.1.2 La matriz inorgánica

la matriz ósea contiene abundantes sales minerales depositadas en forma de cristales de hidroxiapatita o fosfato tricálcico $[Ca_3(PO_4)_2(OH)_2]$ y algo de carbonato cálcico. Todas estas sales se depositan en una redícula formada por las fibras de colágeno. El proceso por el cual estas sales se depositan y cristalizan en la redícula se denomina mineralización. La formación de los cristales de hidroxiapatita está regulada por los osteoblastos.

Al inicio de la mineralización los cristales de sales minerales son depositado entre la matriz de colágeno. Cuando el hueso va madurando los cristales minerales incrementan en tamaño hasta formar la estructura totalmente rígida que constituye el hueso mineralizado.

2.2 LAS CÉLULAS ÓSEAS

En el hueso existen principalmente dos tipos celulares; los osteoblastos y los osteoclastos. Existe un tercer tipo celular que deriva de la diferenciación terminal de los osteoblastos, llamados osteocitos (Figura 3A y 3B). Las células óseas aunque constituyen menos del 2% del volumen total del hueso, protagonizan el desarrollo y remodelado del esqueleto a través de la actividad que llevan a cabo [Baron, 2003].

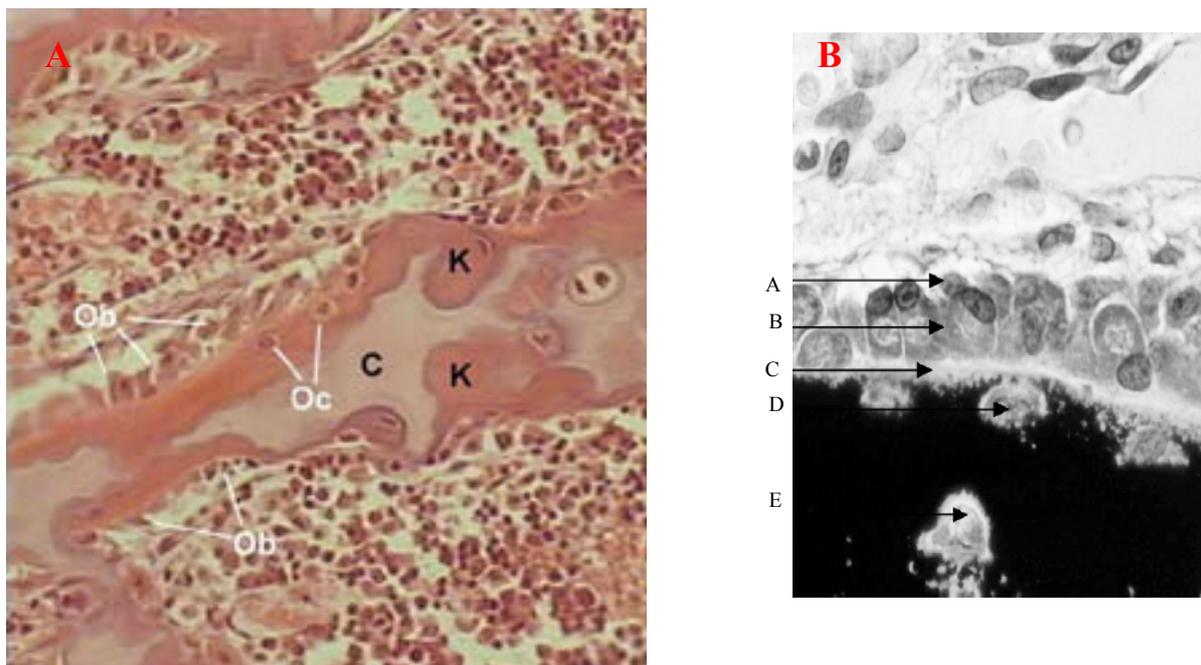


Figura 3: **A:** Imagen de microscopía óptica de un corte transversal de hueso trabecular donde se observan los tipos celulares que lo forman. Ob: Osteoblastos, Oc: Osteoclastos. **B:** Imagen de microscopía óptica de un corte longitudinal de hueso donde se observan los diferentes estadios de diferenciación osteoblástica *in vivo* de forma secuencial. A: pre-osteoblastos, B: osteoblastos, C: osteoide, D: pre-osteoclastos, E: osteoclastos [Baron, 2003].

2.2.1 Osteoblastos:

Los osteoblastos son las células responsables de la formación ósea y del mantenimiento de la arquitectura esquelética. Su función principal es la síntesis y deposición de las proteínas de la matriz del hueso (osteoides). Son células cuboidales con núcleos redondos y citoplasma basófilo que normalmente se encuentran en las superficies óseas (periostio y endostio) formando una única monocapa adherente [Marks y col., 2002]. Bajo el microscopio electrónico los osteoblastos activos presentan las características de una célula secretora con un prominente complejo de Golgi y una gran cantidad de cisternas de retículo endoplasmático rugoso. Son células polarizadas que presentan el núcleo celular en posición distal respecto a la superficie celular, poseen regiones especializadas de la membrana plasmática modificada para el tráfico y la secreción vesicular y para establecer uniones con los osteoblastos adyacentes [Prêle y col., 2003]. La membrana plasmática se caracteriza también por ser rica en fosfatasa alcalina y por poseer receptores para la hormona paratiroidea (PTH), esteroides, estrógenos y 1.25-dihidroxitamina D₃ (vitamina D) [Masi y col., 2001]. Están separados de la matriz ósea mineralizada por una fina capa de matriz no mineralizada.

Los osteoblastos regulan la diferenciación y actividad de los osteoclastos. De esta manera, los osteoblastos, juntamente con los osteoclastos, juegan un papel importante en el recambio óseo y en la homeostasis del calcio.

Los osteoblastos derivan de células progenitoras de origen mesenquimal (MSC) localizadas a la superficie del periostio y en el estroma de la médula ósea [Aubin y col., 2002]. Las células mesenquimales progenitoras o MSC tienen la posibilidad de diferenciarse a mioblastos, fibroblastos, adipocitos, condrocitos u osteoblastos en función de los factores de crecimiento o diferenciación que intervengan [Harada y Rodan, 2003] (Figura 4).

Los osteoblastos son células especializadas que no están diferenciadas terminalmente. Durante el proceso de formación ósea los osteoblastos pueden quedar embebidos en la matriz ósea donde se diferencian hacia un estadio maduro dando lugar a los osteocitos [Marks y col., 2002]. Otro posible destino de las células del linaje de los osteoblastos es convertirse en células de revestimiento (células del endostio o "*lining cells*") las cuales a través de la secreción de factores locales parecen desarrollar un importante papel en el control del remodelado óseo [Manolagas y col., 1995]. Por último, algunos osteoblastos activan su mecanismo apoptótico antes de quedarse embebidos en la matriz ósea [Jilka y col., 1999].

La proliferación y diferenciación de los osteoblastos se produce bajo la influencia de un gran número de factores de transcripción, factores de crecimiento y hormonas [Aubin y col., 2002]. El factor de transcripción Cbfa1/Runx-2 es específico de osteoblasto y es imprescindible para la diferenciación de los osteoblastos actuando en las fases tempranas. Otro factor de transcripción implicado en la diferenciación osteoblástica es Osterix. Se trata de un factor de transcripción específico de osteoblastos que actúa en la etapa más tardía de la diferenciación siendo también imprescindible para que esta tenga lugar [Yang y col., 2002] (Figura 4).

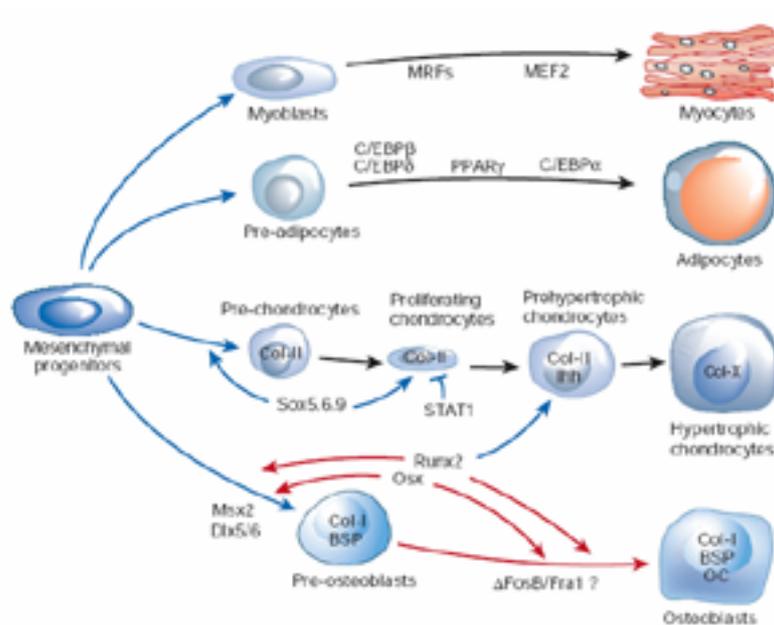


Figura 4: Crecimiento y diferenciación osteoblástica. Aparecen los factores de transcripción específicos para la diferenciación hacia los diferentes tipos celulares [Harada y Rodan, 2003]

2.2.2 Osteoclastos

Los osteoclastos son las células encargadas de la resorción ósea. Normalmente se encuentran en las superficies óseas de gran actividad de remodelado.

Los osteoclastos son células grandes, multinucleadas (entre 4-20 núcleos), de citoplasma acidófilo y ricas en anhídrido carbónico y fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP) [Mundy, 1993]. Tienen una área de la membrana plasmática especializada conocida como borde en cepillo “*Ruffled border*” que puede considerarse como un lisosoma extracelular especializado. Esta área está formada por invaginaciones que tienen un íntimo contacto con la superficie ósea. La resorción tiene lugar en la zona que queda sellada entre el borde en cepillo y la superficie ósea llamada *laguna de Howship*. Los enzimas lisosomales (fosfatasa ácida y colagenasa) se secretan a través del borde en cepillo a la *laguna de Howship* donde las bombas de protones presentes en la membrana citoplasmática de las invaginaciones crean un ambiente ácido que disuelve los constituyentes de la matriz ósea [Masi y col., 2001] (Figura 5).

Los osteoclastos derivan de células hematopoyéticas mononucleares de la médula ósea, concretamente las células formadoras de granulocitos y macrófagos (CFU-GM). Los precursores osteoclasticos mononucleares circulan por la sangre y en la superficie del endostio proliferan, se fusionan formando células multinucleares, forman el borde en cepillo y producen la resorción [Baron, 2003].

El osteoclasto es una célula móvil que después de producir ácidos y enzimas lisosomales en la laguna se desplaza a través de la superficie del hueso para resorber en otro lugar y finalmente desaparece de la zona por un proceso de apoptosis.

En la regulación de la diferenciación y la actividad osteoclástica intervienen un gran número de factores que actúan principalmente a través de los receptores superficiales de los osteoclastos. Entre ellos encontramos al receptor activador del factor nuclear kappa B (RANK) que tiene un papel muy importante en la transducción de la señal de diferenciación y activación de los osteoclastos al unirse a su ligando específico (ver apartado 4.2.2: Regulación local del remodelado óseo).

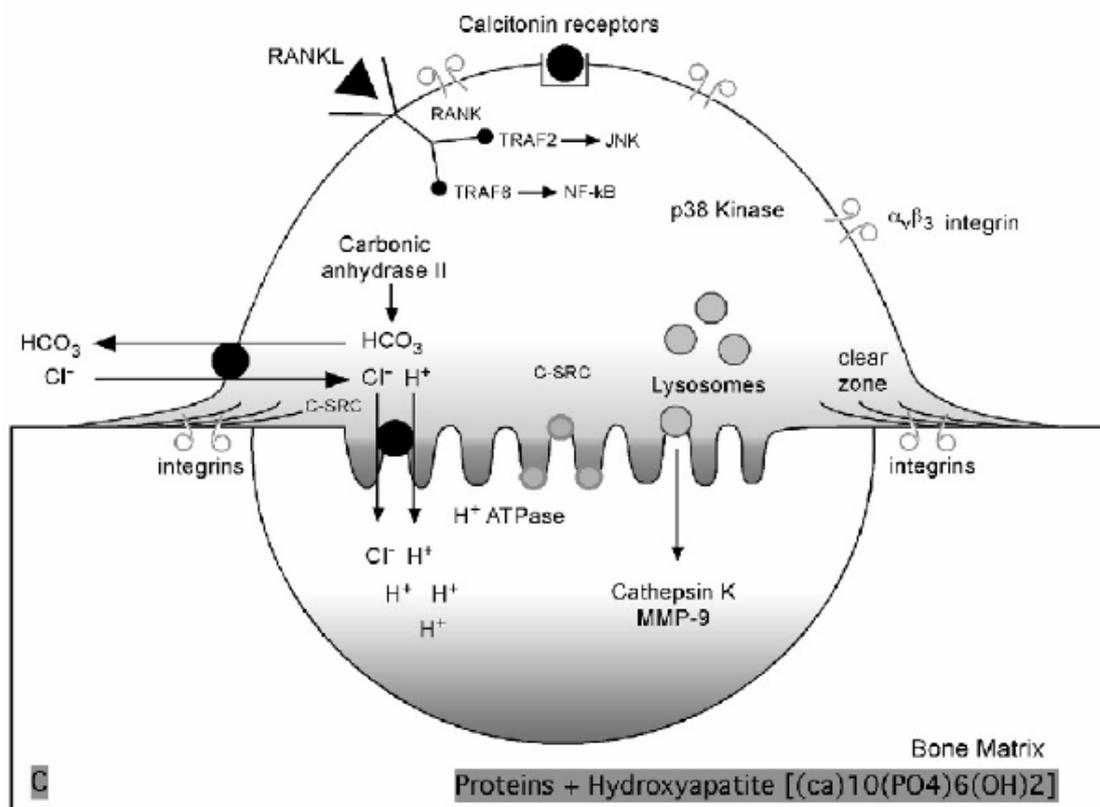


Figura 5: Representación esquemática de un osteoclasto activo polarizado incluyendo los procesos moleculares de la resorción [Baron, 2003].

2.2.3 Osteocitos

Los osteoblastos totalmente diferenciados que quedan embebidos en la matriz ósea mineralizada se convierten en osteocitos (aproximadamente entre el 10-20% de los osteoblastos). Los osteocitos residen en el interior de las lagunas de hueso mineralizado (Figura 6). Tienen disminuida la secreción de proteínas de la matriz debido a la falta de difusión nutricional ya que su única fuente de nutrientes y de intercambio gaseoso es a través de los canaliculos que se han ido formando durante la mineralización. Los osteocitos se comunican con los osteoblastos y células de revestimiento de la superficie ósea a través de “*gap junctions*” que hay entre los canaliculos.

Los osteocitos tienen una morfología variable en función de su edad. Comparten gran parte de las características ultraestructurales con los osteoblastos pero tienen disminuido el volumen celular y la importancia de los organelos celulares implicados en la síntesis proteica (Figura 7).

El destino final de los osteocitos es ser resorbidos por los osteoclastos, tras su apoptosis, juntamente con el resto de elementos que forman la matriz ósea.

Hasta hace algunos años no se había considerado que los osteocitos pudieran ser una pieza clave del metabolismo óseo pero en estudios recientes se ha descrito la importante función que tienen como mecanosensores y en la activación local del remodelado [Baron, 2003].

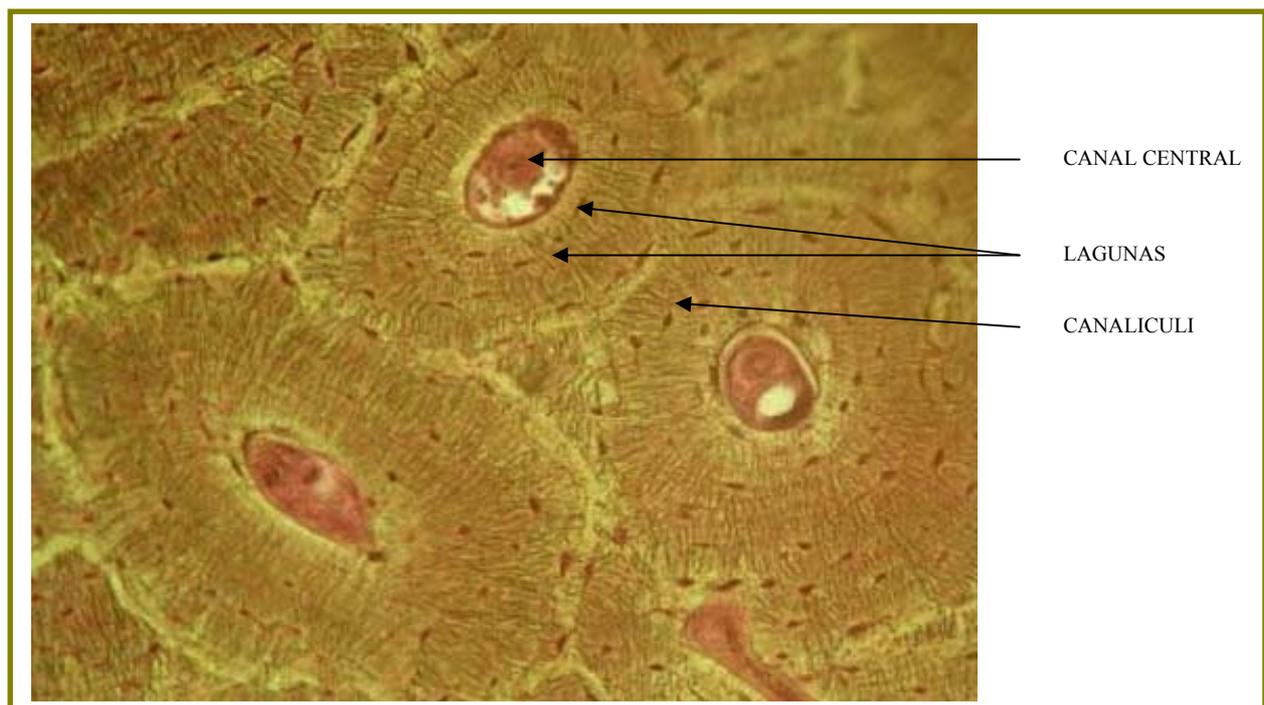


Figura 6: Imagen de microscopía óptica de una sección de hueso cortical. Se observa la histología de sistema de Havers o osteona mostrando la organización lamelar del colágeno en la matriz ósea madura y la morfología y distribución canalicular de los osteocitos. Se observan las lagunas donde residen los osteocitos formando capas en la osteona concéntrica.

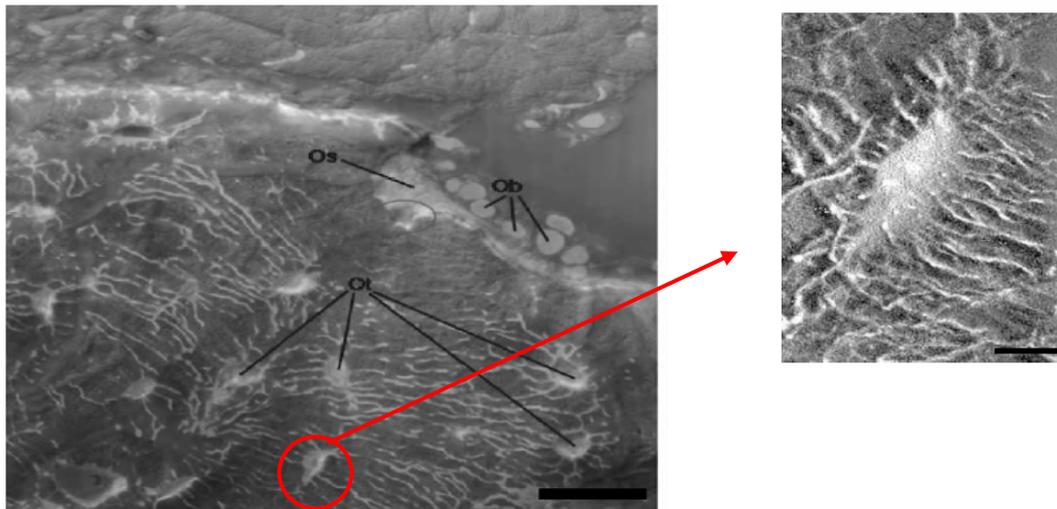


Figura 7: Imagen de microscopía electrónica de un corte longitudinal de hueso largo, donde se puede observar el proceso de formación de los osteocitos. Ob: Osteoblastos presentes a las superficies del periostio. Os: Osteoide sin mineralizar que va formando los osteoblastos en las zonas donde se produce remodelado. Ot: Osteocitos que van quedando dentro de la matriz ósea que va siendo mineralizada. Las prolongaciones que aparecen alrededor de los osteocitos son los canaliculos por donde los osteocitos mantienen el contacto con las superficies para producir el intercambio nutricional y gaseoso [Knothe Tate, 2004]

2.2.4 Células de revestimiento

Las células de revestimiento tienen un origen probablemente osteoblástico y se encuentran recubriendo las superficies del hueso trabecular o endocortical. En el microscopio óptico se presentan como células elongadas, aplanadas y con un núcleo oscuro. Probablemente están implicadas en el inicio y la localización del remodelado. Su función principal se cree que es la protección de la superficie ósea.

3 CRECIMIENTO Y MODELADO ÓSEO

El hueso es un tejido dinámico que se encuentra activo durante toda la vida del individuo. Esta actividad engloba una serie de procesos: el crecimiento, el modelado y el remodelado.

El modelado óseo es el proceso mediante el cual se forma el tejido óseo durante el crecimiento del individuo. Existen dos tipos de proceso involucrados en el desarrollo óseo: osificación intermembranosa (huesos planos) y la osificación endocondral (huesos largos)[Raisz, 1999].

3.1 OSIFICACIÓN INTERMEMBRANOSA

En la osificación intermembranosa, un grupo de células mesenquimales, bajo la influencia de factores de crecimiento locales (*Fibroblast Growth Factor* (FGF) y *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs)), el receptor tipo 1 de la hormona paratiroidea (PTHr1) y los factores de transcripción Cbfa1 y Osterix, se condensan en un área muy vascularizada del tejido conectivo embrionario proliferando y diferenciándose directamente en preosteoblastos y posteriormente en osteoblastos maduros [Baron, 2003].

Los huesos formados por este proceso incluyen el frontal, parietal, partes de la clavícula, los huesos temporal y occipital y la mayoría de los huesos de la cara [Yang, 2002].

3.2 OSIFICACIÓN ENDOCONDRAL

La osificación endocondral se caracteriza por ser un proceso de osificación que se produce en dos etapas, la condrogénesis y posteriormente la osteogénesis. Durante la condrogénesis las células mesenquimales proliferan y se diferencian en precondroblastos y posteriormente en condroblastos. En las mismas condiciones y área que las citadas anteriormente en la osificación intermembranosa, y probablemente bajo una proporción distinta de los factores locales, estas células secretan matriz cartilaginosa y se van quedando embebidas en su propia matriz formando una laguna. Las células en la laguna se encuentran en fase de diferenciación terminal (condrocitos) pero continúan proliferando. Finalmente, estos condrocitos se hipertrofian y disparan la maquinaria celular de muerte programada (apoptosis). En la etapa de osteogénesis se produce una invasión vascular del cartílago y la entrada de osteoblastos progenitores que formaran los centros de osificación. Posteriormente los osteoblastos progenitores se diferenciarán en osteoblastos maduros que secretarán la matriz extracelular específica ósea que reemplazará a la matriz cartilaginosa. Al final de la formación ósea los condrocitos solamente permanecerán en la plataforma de crecimiento donde se produce el crecimiento longitudinal del hueso.

Los huesos formados por este proceso incluyen los de columna vertebral, la pelvis y las extremidades [Yang, 2002].

4 REMODELADO ÓSEO

El remodelado óseo es el proceso mediante el cual el hueso viejo es destruido y sustituido por hueso nuevo. En el adulto, cerca del 8% del tejido óseo se renueva anualmente y esta cifra disminuye con la edad [Serrano y col., 1990]. El remodelado óseo empieza en las primeras etapas del desarrollo fetal hasta el final de la vida del individuo adulto. Es un proceso cíclico donde la matriz mineralizada es resorbida por los osteoclastos siendo sustituida por matriz ósea nueva mediante la acción de los osteoblastos [Raisz, 1999]. El *turn over* del hueso trabecular puede ser hasta 10 veces más rápido que el hueso cortical, dado que la superficie expuesta en el primero es mucho mayor.

4.1 ETAPAS DEL REMODELADO ÓSEO

El remodelado óseo está estrechamente coordinado en el tiempo y en el espacio y se puede dividir en cuatro fases bien diferenciadas (Figura 8).

- **fase inicial o de activación:** En esta fase inicial se produce la interacción entre los precursores de osteoblastos y osteoclastos. Posteriormente empieza la diferenciación de estas células hacia sus formas maduras. En el caso de los preosteoclastos la diferenciación viene precedida por la migración y la fusión para la formación de los osteoclastos maduros multinucleados. La fase inicial incluye también la unión de los osteoclastos maduros a las superficies óseas donde se llevará a cabo la resorción. Las células de revestimiento son las encargadas de dejar las superficies óseas al descubierto contrayéndose y liberando enzimas proteolíticas (colagenasa) para que los osteoclastos puedan producir el anclaje. Este proceso permite que una superficie quiescente se transforme en activa.
- **fase de resorción:** En esta fase los osteoclastos inician el proceso de resorción secretando iones de hidrógeno y enzimas lisosomales, particularmente la catépsina K que a pH ácido es capaz de degradar los componentes de la matriz ósea. La resorción ósea produce cavidades irregulares en el hueso trabecular llamadas lagunas de Howship o de resorción.
- **fase intermedia de reposo o de inversión:** Cuando los osteoclastos terminan su actividad resorptiva desaparecen de la zona mediante un proceso de apoptosis. En este momento la laguna de resorción queda libre y es colonizada por macrófagos que acaban de degradar el colágeno, depositan proteoglicanos para formar la línea de cemento (sustancia que actuará de cohesión entre el hueso viejo y el nuevo), y liberan factores de crecimiento para que empiece la fase de formación. Finalmente las lagunas de resorción son ocupadas por los preosteoblastos [Raisz, 1999].
- **fase de formación:** Esta fase es llevada a cabo por los osteoblastos que se encargan de sintetizar el componente orgánico de la matriz ósea y controlar el depósito de minerales de la matriz ósea [Agerbaek y col., 1991].

De esta manera el remodelado se lleva a cabo por la acción concertada de dos tipos de células óseas, osteoclastos y osteoblastos, llamadas *Basic Multicelular Unit* (BMUs). Las BMUs se activan de manera asincrónica, de forma que mientras unos ciclos se encuentran en fase de resorción, otras están en fase de formación y otras en reposo.

El tiempo necesario para que se produzca un ciclo entero de remodelado óseo es de aproximadamente 6 meses, durante 4 semanas se produce la resorción y el resto para la formación [Recker y col., 2003].

El volumen de hueso nuevo formado, expresado por unidad de tiempo, se denomina recambio óseo o *turn over*. La diferencia entre el volumen formado y el resorbido, expresado por unidad de tiempo, se denomina balance óseo [Serrano y col., 1990].

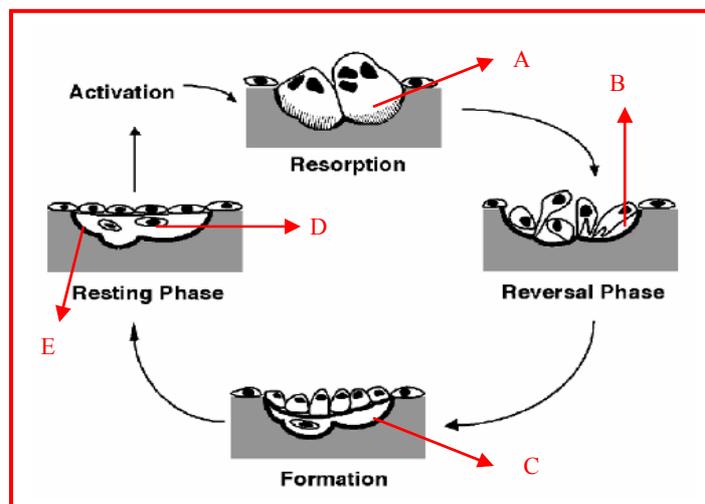


Figura 8: Etapas del remodelado óseo. **A:** Osteoclastos maduros multibucleados encargados de la degradación del hueso. **B:** Osteoblastos que ocupan la laguna de resorción y forman hueso nuevo. **C:** Osteoide formado en la laguna de resorción producida por la acción de los osteoclastos. **D:** Osteoblastos que van quedando embebidos en la matriz transformándose en osteocitos. **E:** Osteoide iniciando el proceso de mineralización [Baron, 2003].

4.2 REGULACIÓN DEL REMODELADO ÓSEO

El proceso de remodelado óseo está regulado por una serie de factores sistémicos y locales que actúan de forma conjunta (Figura 9 y 10).

Tal y como se observa en la figura 9, los factores físicos y químicos que intervienen en el remodelado óseo se pueden separar en dos grupos en función de su papel en la regulación del balance global de la masa ósea. En primer lugar se encuentran los factores que estimulan la formación ósea y en segundo lugar los que favorecen la resorción ósea. Asimismo la acción combinada de estos dos tipos de factores es la que determinará la homeostasis en el tejido óseo.

En la figura 10 se muestran todos los factores conocidos que intervienen en la regulación del remodelado óseo y que de forma directa o indirecta acaban desencadenando una acción local sobre las células óseas creando una imbricada y complicada red de señales positivas y/o negativas de diferenciación y/o activación funcional de las principales células que constituyen el hueso.

Para el estudio detallado de los factores que intervienen en el remodelado, estos se han separado en factores que actúan a nivel sistémico, mayoritariamente hormonas, y factores que actúan a nivel local, mayoritariamente citoquinas y factores de crecimiento. En la tabla 1 aparecen esquematizados en función de la naturaleza los factores más importantes que intervienen en el metabolismo del hueso, separándoles en cuatro grandes grupos: las hormonas, las citoquinas, los factores de crecimiento y los factores estimuladores de colonias o “*Colony stimulating factors*”(CSFs)

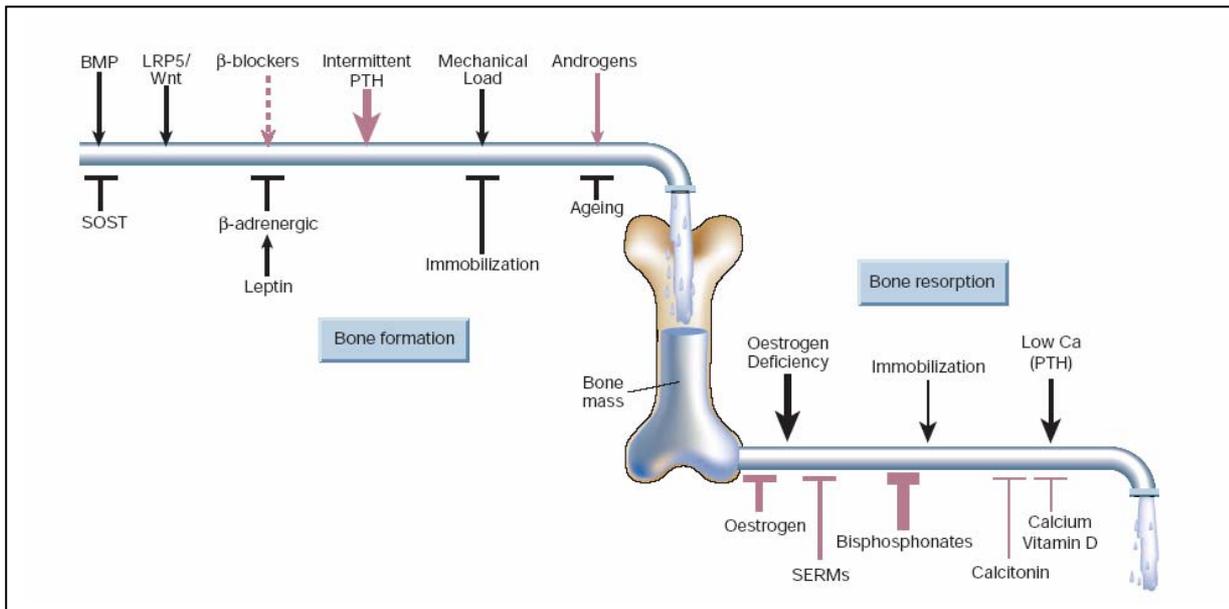


Figura 9: Representación gráfica de la homeostasis ósea. En color azul se indican los factores fisiológicos mientras que en color rosa se indican los factores farmacológicos que pueden ser estimuladores o inhibidores de la formación y la resorción ósea. [Harada y Rodan, 2003].

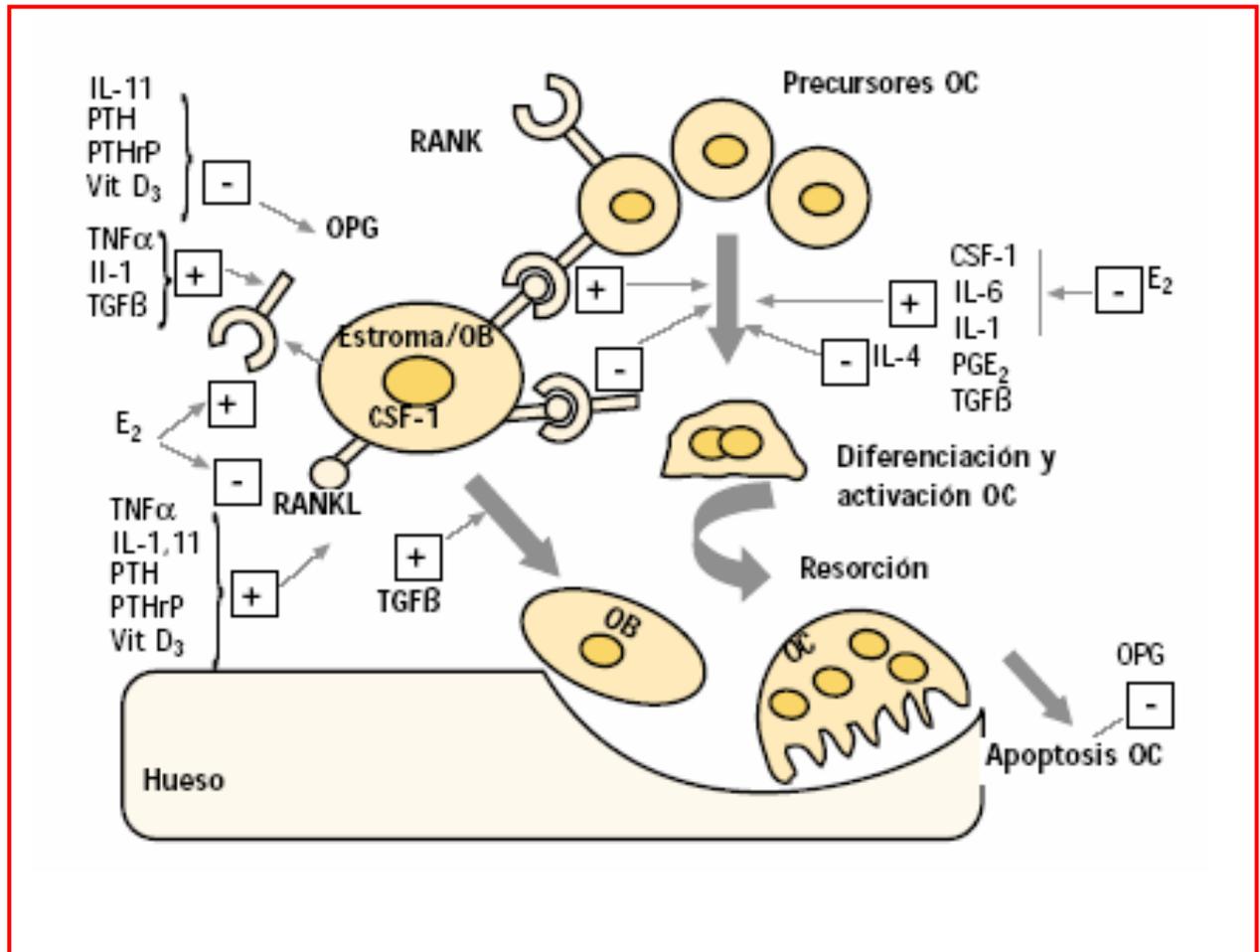


Figura 10: Regulación del remodelado óseo. Aparecen los factores sistémicos y los factores locales más importantes que intervienen en el remodelado y las interconexiones que se producen entre ellos [Gutierrez, 2004]

Tabla 1: Factores reguladores del remodelado que intervienen en el metabolismo óseo [Masi y Brandi, 2001]

FACTORES REGULADORES DEL REMODELADO ÓSEO		
Hormonas	calcitrópicas	Hormona paratiroidea (PTH) Vitamina D Calcitonina
	No calcitrópicas	Hormona tiroidea Glucocorticoides Hormonas sexuales (andrógenos y estrógenos) Hormona del crecimiento Insulina Prostaglandinas (PG)
Citoquinas	Interleucinas	IL-1 α y IL-1 β IL-2 IL-3 IL-4 IL-5 IL-6 IL-11
	Otras citoquinas	OPG RANKL <i>Tumor necrosis factor (TNFα)</i>
Factores de crecimiento	<i>Insulin-like growth factor I y II</i> <i>Fibroblast growth factor (FGF)</i> <i>Platelet-derived growth factor (PDGF)</i> <i>Transforming growth factor α, β1, β2 y β3</i> <i>Epidermal growth factor</i> <i>Bone morphogenetic proteins (BMPs)</i>	
Colony stimulating factors (CSFs)	<i>Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)</i> <i>Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF)</i> <i>Macrophage colony stimulating factor (M-CSF)</i>	

4.2.1 Regulación sistémica del remodelado óseo

El metabolismo óseo se encuentra regulado por una gran variedad de hormonas que pueden actuar sobre los osteoclastos y/o los osteoblastos de forma directa o indirecta regulando la producción o actividad de un factor local.

Las funciones metabólicas del esqueleto están reguladas en gran parte por las hormonas implicadas en la homeostasis del calcio: la PTH y la vitamina D. Una tercera hormona, la calcitonina, que actúa como inhibidor de la resorción, puede tener un papel importante en el desarrollo del esqueleto pero parece ser que tiene poca importancia en la regulación del remodelado en los adultos.

La PTH es un polipéptido secretado por las células principales de las glándulas paratiroideas que regula la concentración de calcio en sangre. Es un potente estimulador de la resorción ósea y tiene un efecto bifásico en la formación ósea. En elevadas concentraciones produce una inhibición aguda de la síntesis de colágeno pero con administraciones prolongadas e intermitentes de la hormona se produce un incremento de la formación ósea, propiedad que la ha convertido clínicamente en un importante agente anabólico. Las concentraciones de PTH tienden a aumentar con la edad y esto produce un aumento del remodelado óseo y una consecuente pérdida de masa ósea, principalmente del hueso cortical.

La vitamina D tiene su efecto más importante en la absorción intestinal de calcio y fosfato, pero también tiene un efecto directo sobre el hueso y otros tejidos. Probablemente la vitamina D es una hormona crítica para la diferenciación de los osteoblastos y los osteoclastos y estimula la resorción ósea en determinadas condiciones experimentales.

La hormona del crecimiento estimula la formación y la resorción a través de la producción local y sistémica del factor de crecimiento de la insulina (IGF).

Los glucocorticoides son necesarios para la diferenciación celular en el tejido óseo durante el desarrollo embrionario, pero después del nacimiento su función más importante es la inhibición de la formación ósea. Los efectos indirectos de los glucocorticoides sobre la absorción de calcio y la producción de hormonas sexuales resultan en un aumento de la resorción.

Las hormonas tiroideas pueden estimular tanto la resorción ósea como la formación ósea y son críticas para el mantenimiento del remodelado óseo normal.

Las hormonas sexuales (estrógenos y andrógenos) son factores sistémicos que desempeñan un papel importante en la maduración del hueso y en la prevención de la pérdida ósea. Probablemente la hormona sistémica que juega un papel más importante en el mantenimiento del remodelado normal sea el estrógeno. La deficiencia estrogénica provoca un incremento de la resorción produciéndose una ventaja de la resorción ósea en frente a la formación. Los estudios hasta la actualidad sugieren que los estrógenos actúan alterando la producción y/o actividad de algunos factores locales reguladores de los osteoblastos y precursores de osteoclastos [Raisz, 1999]. Los efectos de los andrógenos sobre el hueso son fundamentalmente anabólicos de forma que facilitan la actividad osteoblástica. También inhiben indirectamente la resorción ósea disminuyendo la secreción de citoquinas como la IL-6 [Fité y Nolla, 2004].

4.2.2 Regulación local del remodelado óseo

El remodelado óseo implica complejas interacciones entre el osteoclasto y las otras células presentes en el microambiente del hueso. Las interacciones entre células pueden regular la resorción ósea de dos formas distintas: actuando sobre el número de osteoclastos presentes [Walker, 1975.1] o actuando sobre la capacidad resortiva de estos osteoclastos [Walker, 1975.2]. Las células presentes en el microambiente de los osteoclastos incluyen las células medulares progenitoras, osteoblastos, macrófagos, linfocitos T y células medulares. Todas estas células, incluyendo los osteoclastos, producen citoquinas y factores de crecimiento que producen efecto sobre la formación y/o la actividad osteoclástica [Roodman, 1993].

Entre los factores locales tenemos el TGF β que actúa modulando la maduración de los osteoclastos y de las células del estroma precursoras de osteoblastos. Estimula la síntesis de osteoprotegerina (OPG) por lo que se lo considera un regulador de gran importancia en el enlace entre las células que regulan el remodelado óseo.

También tienen una función importante en la regulación del remodelado las *bone morphogenetic proteins* (BMPs) que son factores de crecimiento pertenecientes a la súper familia de los *transforming growth factor-beta* (TGF β). Son péptidos que tienen receptores celulares específicos y se ha visto que tienen un papel crítico en la regulación del remodelado actuando sobre la diferenciación osteoblástica, favoreciéndola, e inducen a la formación ósea y de cartílago durante el desarrollo esquelético [Katagiri y Takahashi, 2002].

Las citoquinas como la IL-1, IL-4, IL-6, IL-11 y el TNF juegan un importante papel regulador durante la osteoclastogénesis y la activación osteoclástica. La IL-1 y IL-6 aumentan la resorción ósea y su síntesis es inhibida por los estrógenos. Por este motivo la disminución estrogénica que se produce después de la menopausia provoca el aumento de la síntesis de estas dos citoquinas aumentando la resorción ósea, siendo una de las causas importantes de la osteoporosis posmenopáusica. La IL-4, a parte de su función antiinflamatoria, inhibe la resorción y estimula la proliferación y activación de varios tipos celulares.

La IL-11 estimula la diferenciación de los osteoblastos y la formación de matriz ósea, posiblemente a través de las BMPs, y por este motivo parece tener un efecto preventivo en la pérdida ósea asociada a la edad avanzada. El TNF estimula la resorción ósea directa o indirectamente a través de la estimulación del RANKL.

Recientemente se ha encontrado que el óxido nítrico (NO) puede tener un efecto anabólico en el hueso. Existen numerosos factores que pueden tener un papel importante en el remodelado óseo en condiciones fisiológicas determinadas como las prostaglandinas, TGF- α , IGF I y II, PDGF y los retinoides [Gutierrez, 2003].

Ha sido de gran importancia la identificación de un sistema formado por tres proteínas que se ha visto que juega un papel clave en la regulación de la osteoclastogénesis y la resorción ósea. La osteoprotegerina

(OPG), llamada inicialmente factor inhibidor de los osteoclastos (OCIF), fue la primera proteína identificada y se vio que inhibía la formación de los osteoclastos [Suda y col., 1997] y [Simonet y col., 1997]. Posteriormente su ligando fue clonado y nombrado factor de diferenciación de los osteoclastos (ODF) o ligando del receptor nuclear kappa B (RANKL) o ligando de la OPG (OPGL). El receptor para este ligando se encontró que era el receptor del factor nuclear kappa B (RANK) y se encontraba en la superficie de las dendritas y de los osteoclastos.

La interacción entre el RANKL y RANK produce la fusión y diferenciación de los precursores de los osteoclastos para formar osteoclastos activos, y también induce el aumento de la actividad de estos osteoclastos [Suda y col, 1999]. La OPG es el receptor señuelo (“decoy”) que bloquea esta acción.

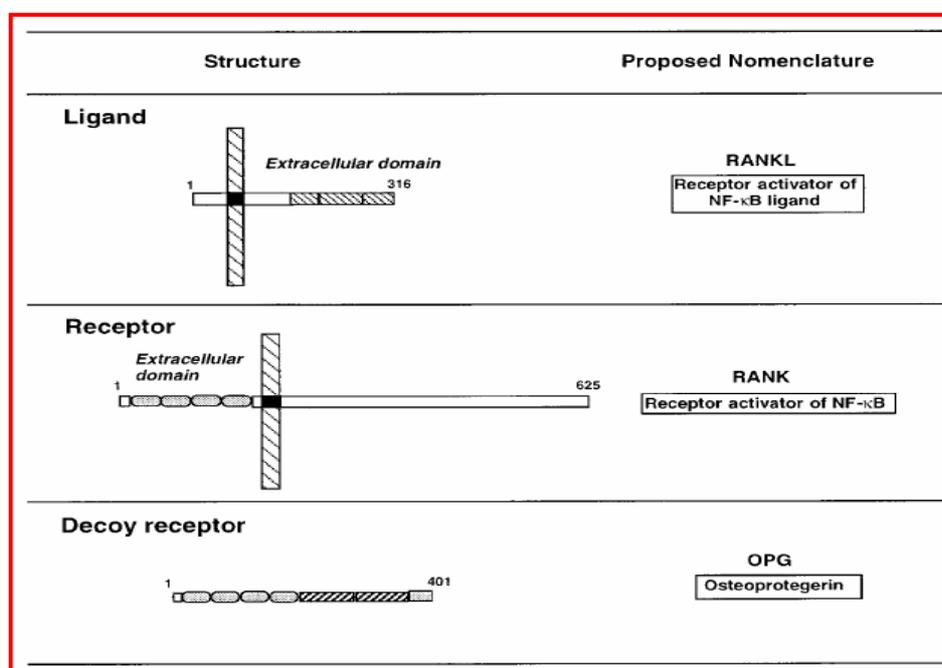


Figura 11: Representación esquemática de la estructura proteica del RANKL, RANK y OPG [Suda y col, 1999].

La osteoprotegerina (OPG) fue identificada simultáneamente por dos grupos que trabajaban independientemente [Simonet y col., 1997] y [Suda y col., 1997]. Identificaron un nuevo miembro de la súperfamilia de los receptores del *tumor necrosis factor* (TNF-R), que parecía jugar un papel básico en la regulación del remodelado óseo. Se observó que los ratones que sobreexpresaban OPG manifestaban osteopetrosis mientras que los ratones anulados “*knockout*” para este gen manifestaban osteoporosis severa [Burgess y col., 1999].

La OPG es un péptido de 401 aminoácidos, 21 de los cuales se eliminan en el proceso de maduración de la proteína quedando con 380 aminoácidos en su forma madura, momento a partir del cual pierde sus dominios transmembrana y citoplasmáticos y es secretada como proteína soluble (al contrario que otros receptores de la familia de los TNF-R que se encuentran unidos a la membrana). Esta característica hace

que la OPG sea un buen candidato como factor autocrino o paracrino dentro del microambiente extracelular del hueso [Simonet y col., 1997] y [Yasuda y col., 1998](Figura 11).

Su extremo N-terminal contiene 4 dominios ricos en cisteína (D1-D4) y es el más estrechamente relacionado con el receptor-2 del TNF y con el CD40. La OPG es una glicoproteína con cuatro o cinco sitios potenciales de glicosilación [Simonet y col., 1997] y [Kwon, 1998]. Es sintetizada como monómero y se ensambla formando un homodímero unido por un puente disulfúrico. Cuando la proteína se encuentra dimerizada es excretada al exterior de la célula [Simonet y col., 1997]

La OPG se ha identificado en ratón, rata y humano, guardando una gran homología entre las tres especies [Simonet y col., 1997].

Su expresión a nivel tisular no se limita únicamente al hueso sino que presenta una distribución en gran cantidad de tejidos. En tejido humano fetal se ha detectado expresión sobre todo en pulmón, riñón, hígado y cerebro. En tejido humano adulto, se han detectado niveles altos de RNA mensajero de OPG en corazón, pulmón, riñón y hueso [Simonet y col., 1997]; [Yasuda y col., 1998] y [Tan y col 1997]. En menor cantidad también se ha encontrado expresión en placenta, hígado, glándula tiroidea, médula espinal, cerebro, algunos tejidos implicados en la respuesta inmunológica y hematopoyéticos [Simonet y col., 1997] y [Yasuda y col., 1998].

El gen de la *OPG* se localiza en el cromosoma 8q23-24 [Simonet y col., 1997] y [Kwon, 1998] y es un gen de copia única. Tiene 5 exones y ocupa 29 Kb del genoma humano.

La OPG actúa como receptor señuelo (*decoy receptor*) de RANKL y del ligando relacionado con el TNF [Hofbauer y col., 2001]. Sus funciones principales son la inhibición de la fusión, diferenciación y supervivencia de los precursores de osteoclastos y también la supresión de la activación y promoción de la apoptosis de los osteoclastos [Lacey y col., 1998]; [Yasuda y col., 1998]; [Jimi y col., 1999]; [Fuller y col., 1998]; [Lacey y col., 2000]; [O'Brien y col., 2000]; [Miyamoto y col., 1998]; [Akatsu y col., 1998]; [Hakeda y col., 1998] y [Udagawa y col., 2000].

El ligando del receptor activador del factor nuclear kappa B o factor de diferenciación osteoclástica (RANKL) fue descrito posteriormente al descubrimiento de la OPG con la intención de buscar su ligando [Lacey y col., 1998] y [Yasuda y col., 1998]. Es un péptido de 317 aminoácidos con una elevada homología a los miembros de la familia de los TNF [Lacey y col., 1998] y [Yasuda y col., 1998]. RANKL puede encontrarse localizada en la membrana con un peso molecular de 40-45 kDa o soluble con un peso molecular de 30 KDa (liberación de la parte N-terminal, que constituye el dominio transmembrana)(Figura 11). En el hueso es sintetizado principalmente por los osteoblastos y las células del estroma, pero también puede ser sintetizado por los osteoclastos, las células mesenquimales del periostio, los condrocitos y las células endoteliales [Lacey y col., 1998]; [Yasuda y col., 1998]; [Wong y col., 1997]; [Anderson y col., 1997] y [Kartsogiannis y col., 1999]. No es una proteína específica de hueso ya que se han observado niveles elevados de RANKL en la médula ósea y en los tejidos linfáticos (nódulo linfático, timo, bazo y hígado fetal) [Lacey y col., 1998] y [Anderson y col., 1997].

El gen del *RANKL* se encuentra localizado en el cromosoma 13q14. El promotor tiene elementos de respuesta a la Vitamina D y a glucocorticoides así como sitios de unión para el factor de transcripción osteoblástico Cbfa-1 [Gao y col., 1998]. El análisis de la estructura del gen *RANKL* en el ratón mostró que es un gen de copia única, con 5 exones y que ocupa 40 Kb del genoma [Kitazawa y col., 1999].

Su función más importante en el hueso es la estimulación de la diferenciación, actividad y adherencia de los osteoclastos a las superficies óseas así como la inhibición de su apoptosis [Malyntkar y col., 2000] y [Lacey y col., 1998]. El *RANKL* también tiene funciones relacionadas con las células del sistema inmunitario y con las dendritas del sistema nervioso. El *RANKL* y el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), son suficientes y necesarios para la diferenciación de los precursores osteoclasticos hacia un estado celular maduro [Lacey y col., 1998] y [Yasuda y col., 1998 b].

El receptor activador del factor nuclear kappa B (*RANK*) es el receptor osteoclastico de *RANKL* que transduce la señal al interior de la célula [Anderson y col., 1997] y [Hsu y col., 1999]. El *RANK* humano es un péptido de 616 aminoácidos homóloga a la familia de los receptores del TNF (Figura 11). Es una proteína transmembrana y se expresa en células de la línea de los macrófagos/monócitos incluyendo las células preosteoclasticas, células T y B, células dendríticas y fibroblastos [Anderson y col., 1997] y [Hsu y col., 1999](Figura 14).

El *RANK* se expresa en el hueso y en otros tejidos como la musculatura, el hígado, el intestino delgado, el colon, el timo y la glándula adrenal. Los ratones *Knockout* para *RANK* desarrollan profundas osteopetrosis como consecuencia de la ausencia de osteoclastos, y la osteoclastogénesis se inicia en estos ratones al transferirles cDNA de *RANK* en los precursores hematopoyéticos.

La respuesta de *RANK* por la interacción con *RANKL* consiste en la activación secuencial de proteínas que transducen el señal intracelularmente que terminará con la activación del factor nuclear kappa-B (NF- κ B) y JNK [Anderson y col, 2000] y [Hsu y col, 1999].

RANK se encuentra localizado en el cromosoma 18q22.1 y en humanos da lugar a un transcrito de 4.5kb [Anderson y col, 1997].

En la regulación de este sistema proteico interviene un gran número de factores reguladores que en función de la acción pro-resortiva o anti-resortiva que lleven a cabo actuarán modificando el balance neto entre *RANKL* y OPG (Figura 12).

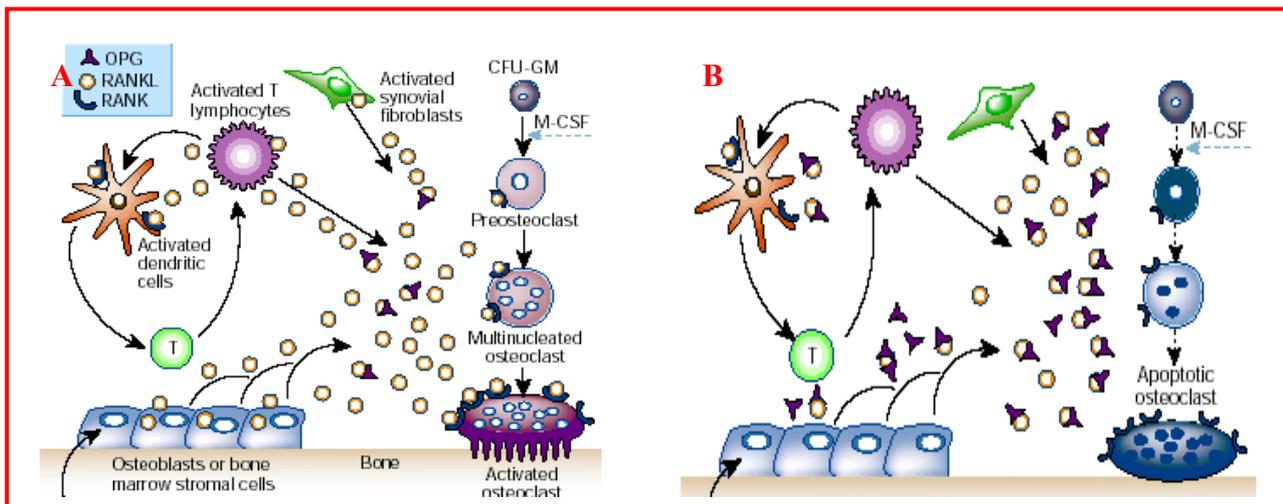


Figura 12: Esquema de la regulación del sistema OPG/RANKL/RANK a través de los factores sistémicos y locales (hormonas calcitropicas y citoquinas). A: Respuesta del sistema de regulación OPG/RANKL/RANK cuando actúan los factores pro-resortivos o factores calcitropos. B: Respuesta del sistema de regulación OPG/RANKL/RANK cuando actúan los factores anabólicos o anti-resortivos [Boyle y col., 2003].

Este sistema tiene un papel importante en la osteoporosis posmenopáusica asociada a la deficiencia estrogénica. Existen evidencias *in vitro* e *in vivo* del efecto mediador de la OPG en el papel protector del estrógeno sobre el metabolismo óseo. *In vitro*, se ha encontrado que los estrógenos inducen la expresión génica de OPG por parte de las células del linaje osteoblástico [Hofbauer y col., 1999]. Además, los estrógenos también suprimen la susceptibilidad de los osteoclastos al RANKL mediante la represión de c-Jun. *In vivo*, el tratamiento con OPG previene la pérdida de masa ósea en roedores ovariectomizados a través de la inhibición de la resorción osteoclástica [Simonet y col., 1997]. Varios estudios demuestran que la expresión génica de la OPG disminuye con la edad y que esta acción se puede revertir con la terapia hormonal sustitutiva [Makhluf y col., 2000]. En estudios clínicos donde se evalúa la administración de OPG en mujeres posmenopáusicas se observa una marcada supresión de marcadores bioquímicos del remodelado óseo [Bekker y col., 2001]. Los estudios en mujeres en los cuales se han correlacionado los niveles de OPG en suero con marcadores del metabolismo óseo han producido resultados controvertidos. Estos estudios, pero, demuestran una relación con la edad y el aumento de la OPG, viéndose los niveles más altos de OPG sérica en las pacientes con niveles más altos de remodelado y con osteoporosis severa [Yano y col., 1999]; [Arrighi y col., 1998] y [Arrighi y col., 2000].

5 OSTEOPOROSIS

5.1 DEFINICIÓN

La osteoporosis se define como un trastorno esquelético sistémico caracterizado por una baja densidad mineral ósea y un deterioro de la microarquitectura del tejido óseo, con un consiguiente aumento de la fragilidad y la susceptibilidad a las fracturas. El remodelado normal del hueso depende del equilibrio entre la formación y la resorción. La osteoporosis es el resultado de un balance negativo, debido a un desequilibrio entre estas dos actividades [Guía SEIOMM, 2003].

La masa ósea es la cantidad de hueso que presenta una persona en su esqueleto en un momento determinado. La cantidad de masa ósea de una persona va aumentando paulatinamente desde el nacimiento, a medida que va creciendo el esqueleto, hasta alcanzar un valor máximo (que llamamos “pico de masa ósea”) alrededor de los 30-35 años, en el momento de la madurez esquelética (Figura 13). En este período de tiempo disponemos de la mayor cantidad de masa ósea de toda nuestra vida.

El pico de masa ósea está bajo control genético y se encuentra afectado por el estilo de vida, la nutrición y las enfermedades durante el desarrollo esquelético.

La resistencia ósea depende dos hechos importantes: la densidad mineral y la calidad ósea. La densidad mineral ósea (BMD) se expresa en gramos de mineral por área o por volumen y en cualquier individuo ésta viene determinada por el pico de masa ósea obtenido durante el crecimiento y la cantidad de pérdida de hueso. La calidad ósea se refiere a la arquitectura, al recambio, al daño acumulado (por ejemplo las microfracturas) y a la mineralización (Figura 14).

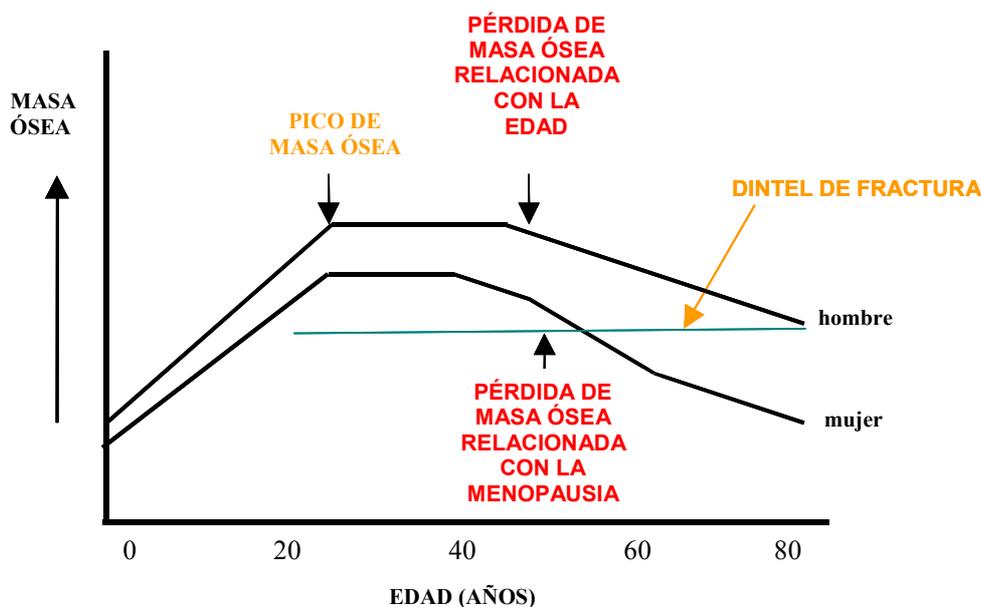


Figura 13: Evolución de la masa ósea que se produce a lo largo de la vida en el hombre y la mujer.

Clínicamente la osteoporosis se reconoce por la presencia de fracturas traumáticas que se localizan más frecuentemente en la cadera, la espina dorsal, y el antebrazo distal.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), en 1994, con el objetivo de crear una definición de osteoporosis que incorporase masa ósea y fractura, estableció las siguientes definiciones que se esquematizan en la tabla 2 (ver Tabla 2):

CATEGORÍA	DEFINICIÓN POR DENSIDAD MINERAL ÓSEA
Normal	Un valor de DMO mayor de -1 DE al valor medio del adulto joven
Osteopenia	Un valor de DMO de entre -1 y -2.5 DE al valor medio del adulto joven
Osteoporosis	Un valor de DMO mayor de -2.5 DE al valor medio del adulto joven
Osteoporosis severa	Un valor de DMO mayor de -2.5 DE al valor medio del adulto joven con la presencia de una o más fracturas por fragilidad

Tabla 2: Categorías diagnósticas de la osteoporosis basadas en el criterio de la OMS. DMO: Densidad Mineral Ósea. DE: Desviación estándar.

La fractura se produce cuando la fuerza inducida por una caída se aplica a un hueso osteoporótico. Por lo tanto, la osteoporosis es un importante factor de riesgo para la fractura y deben distinguirse entre aquellos factores de riesgo que afectan el metabolismo óseo y los relacionados con las fracturas.

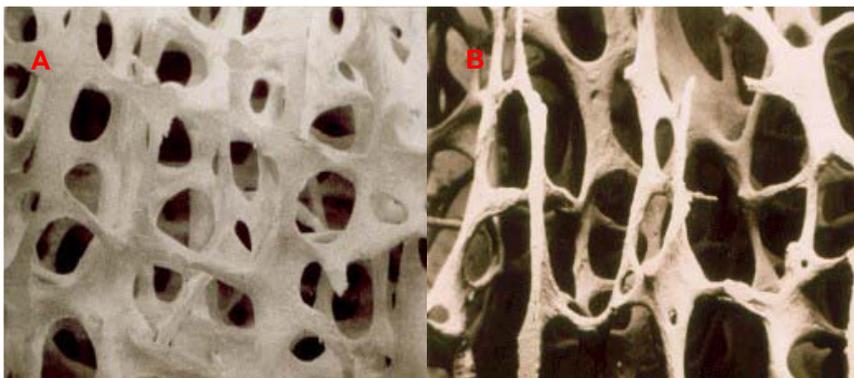


Figura 14: Fotografía de microscopía de barrido donde se muestra la microarquitectura del hueso. **A:** Hueso normal, **B:** Hueso osteoporótico.

5.2 CLASIFICACIÓN DE LA OSTEOPOROSIS

La osteoporosis puede clasificarse en primaria y secundaria. La osteoporosis primaria puede producirse en ambos sexos y a cualquiera edad, pero es más frecuente en las mujeres posmenopáusicas y en varones en las etapas más tardías de la vida. La osteoporosis secundaria se produce principalmente como

consecuencia de un tratamiento farmacológico o una enfermedad intercurrente. Como ejemplos, podemos citar la osteoporosis inducida por glucocorticoides, el hipogonadismo, el hipertiroidismo y la enfermedad celíaca. En los varones, entre el 30% y el 60% de las osteoporosis son secundarias debido la mayoría de veces a hipogonadismo, tratamiento con glucocorticoides o alcoholismo. En la mujer premenopáusica, más del 50% de las osteoporosis diagnosticadas se asocian a causas secundarias, destacando la hipoestrogenemia, el tratamiento con glucocorticoides, el exceso de hormona tiroidea y la terapia anticonvulsivante. En cambio en la mujer posmenopáusica, la prevalencia de la osteoporosis secundaria es mucho más baja, aunque su proporción exacta se desconoce. En las mujeres posmenopáusicas de raza blanca, se han descrito como otras posibles causas de osteoporosis la existencia de hipercalciuria, hiperparatiroidismo primario y malabsorción.

5.2.1 Osteoporosis masculina

La osteoporosis en el varón no está tan bien caracterizada como en la mujer. Su diagnóstico densitométrico no goza del consenso establecido en la mujer posmenopáusica (OMS, 1994), aunque varios estudios que relacionaron fractura de cuello femoral con densidad mineral ósea, ofrecieron valores similares a los de la mujer posmenopáusica [Karlsson, 1993] y [Blanch J y col., 1997]. Su frecuencia es menor que la femenina en España [Diaz Curiel y col., 1996]. Sin embargo, su importancia socioeconómica es muy elevada tal y como muestra el estudio EVOS [O'Neill y col., 1996], realizado con población europea de diversas latitudes, en que el número de fracturas vertebrales es similar en mujeres y varones. Si nos ceñimos a los datos de nuestro país, las fracturas femorales, de mayor relevancia clínica y económica, son menores en el varón, aunque aumentan junto con la esperanza de vida, y presentan un índice de complicaciones mayor que en la mujer [Cooper y col., 1992].

La incidencia de fracturas es mayor en hombres que en mujeres desde los 18 hasta los 40 a 50 años de edad. A partir de los 50 años esta tendencia cambia, especialmente en las fracturas de la pelvis, húmero, codo y fémur siendo más frecuentes en mujeres. Por ejemplo, las fracturas de cadera tienen una incidencia de 2 a 1 a favor de las mujeres. A pesar de ello, la incidencia de fracturas por traumas menores en hombres, en especial de la columna vertebral y la pelvis, también se incrementa rápidamente con la edad reflejando un incremento de la fragilidad ósea. Por razones aún no muy claras la incidencia de fracturas de cadera en hombres tiene una tendencia a incrementarse más rápidamente que en las mujeres con la edad. Posiblemente por las enfermedades asociadas, la mortalidad asociada con fracturas de cadera en los hombres mayores de 75 años de edad, es considerablemente más alta que en las mujeres.

Si nos ceñimos al estado metabólico óseo, en la osteoporosis masculina primaria (OMI), aparece una disminución de la formación ósea, determinado con marcadores de remodelado óseo [Kelepouris y col., 1995]; [Ciria y col., 1998] y [Kurland y col., 1997] y con estudios histomorfométricos [Ciria y col., 1998]; [Kurland y col., 1997]; [Jackson y col., 1987]; [Jackson y col., 1990]; [DeVernejoul y col., 1983] y

[Nordin y col., 1984]. Las características de las osteoporosis masculinas secundarias no son homogéneas, dependiendo de la causa subyacente.

Estudios histomorfométricos muestran que una proporción significativa de los pacientes con osteoporosis idiopática tienen una formación ósea reducida debido a una disminución de la actividad osteoblástica [Wong y col., 1994]. Este fenómeno podría ser causado por una disfunción intrínseca del osteoblasto o por anomalías en la regulación extrínseca de la actividad de estos. Los estudios histomorfométricos no han sido capaces hasta el momento de diferenciar entre los dos posibles mecanismos de actuación, por lo que se requieren estudios futuros a nivel celular.

Existen estudios anteriores con cultivos celulares que presentan resultados dispares: Se demostró una disminución de la proliferación celular de los osteoblastos procedentes de pacientes con OMI, sin que su funcionalismo se viera afectado [Marie y col., 1991] y [Marie y col., 1993]. En posteriores estudios no se hallaron diferencias en la proliferación celular osteoblástica, pero sí que se constató una disminución de la síntesis de osteocalcina y de fosfatasa alcalina ósea al añadir vitamina D al cultivo celular a diferencia de los controles en los que la adición de la vitamina D aumentaba la expresión de estos genes. Este hecho podría explicarse por la existencia de una frenación de los osteoblastos cultivados, o por una alteración de los receptores celulares de la vitamina D [Wong y col., 1994]. Posteriormente se observó una disminución tanto de la proliferación osteoblástica como de su actividad en los varones con OMI [Battmann y col., 1997]. Hallazgos similares se encontraron al evaluar la actividad osteoblástica de varones de edad avanzada “normales”, en los que se encontró una menor síntesis de osteocalcina tras la estimulación de los cultivos con vitamina D. Por último se compararon los cultivos celulares de osteoblastos procedentes de mujeres y varones, concluyendo que presentan un comportamiento diferente. La menor proliferación celular observada en las mujeres, no aparecía en varones [Kaltburg y col., 1999].

5.2.2 Osteoporosis posmenopáusica

La pérdida de masa ósea en las mujeres posmenopáusicas se produce en dos fases; una primera pérdida rápida que dura unos 5 años (más de 3% por año en la columna) seguida de una fase más lenta y generalizada.

El mecanismo más importante de pérdida ósea de la primera fase es la deficiencia estrogénica. Durante la menopausia los niveles de estradiol presentes en la circulación disminuyen un 90%. El resultado de la deficiencia es el aumento de la activación del remodelado favoreciendo un balance a favor de la resorción. El estrógeno actúa parcialmente a través de los osteoblastos (aumento de *Insulin-like growth factor I* (IGF-1), OPG y *transforming growth factor β* (TGF β)) y a través de los monocitos presentes en la médula ósea (disminuye la síntesis de IL-1 y de *tumor necrosis factor α* (TNF α)). Esta modulación local de factores de crecimiento y citoquinas producidos por el estrógeno tienen efecto tanto sobre los osteoblastos como osteoclastos. Asimismo el incremento de citoquinas producido por la deficiencia de

estrógenos (por ejemplo IL-1) produce un velocidad más elevada de pérdida de masa ósea en las mujeres posmenopáusicas.

En la fase lenta de pérdida de masa ósea de la mujer posmenopáusica actúan los factores relacionados con la edad como el incremento de los niveles de PTH y la senescencia de los osteoblastos. El incremento de PTH se produce como consecuencia de la disminución de la reabsorción de calcio renal y de la absorción de calcio intestinal. También se piensa que el aumento de la PTH puede ser un resultado indirecto de la deficiencia estrogénica [Cooper, 2003].

5.3 EPIDEMIOLOGÍA

La osteoporosis al manifestarse mayoritariamente a edades avanzadas se ha convertido en una enfermedad de gran importancia clínica y socioeconómica como consecuencia del aumento de la esperanza de vida de la población. Es la enfermedad metabólica ósea más prevalente ya que afecta a un 35% de mujeres españolas mayores de 70 años. Una de cada 5 mujeres de más de 50 años tiene al menos una fractura vertebral debida a la osteoporosis, que se asocia al deterioro de la calidad de vida y a un riesgo aumentado de otras fracturas. La incidencia anual de fractura de fémur en mujeres de edad superior a 50 años es de 3% mientras que la incidencia de fractura de antebrazo distal es casi del doble. En la actualidad, el riesgo de padecer una fractura de fémur en lo que le resta de la vida es, para una mujer española de 50 años, de entre un 12% y un 16%. La presencia de fracturas, especialmente de fémur, conlleva un aumento de la mortalidad con relación a las pacientes sin fracturas.

5.4 CAUSAS DE LA OSTEOPOROSIS

5.4.1 Factores genéticos:

Estudios epidemiológicos demuestran la importancia de la genética en la determinación no solamente de la masa ósea y arquitectura, sino también en el remodelado y la propensión a fractura [Ralston, 1997]. El riesgo de osteoporosis aumenta en individuos con historia familiar de fracturas [Grainge y col., 1999].

Existen numerosos estudios que analizan polimorfismos de genes candidatos que puedan relacionarse con la predisposición a padecer osteoporosis [Ralston, 1997]. El primer gen candidato para analizar posibles polimorfismos fue el receptor de la vitamina D (VDR) [Morrison y col., 1994]. Otros candidatos que se han estudiado incluyen el receptor de estrógenos, el TGF β y el colágeno α 1 [Deng y col., 1998]; [Grainger y col., 1999] y [Uitterlinden y col., 1998]. Lo que sabemos hoy en día es que la osteoporosis es un desorden poligénico de etiología multifactorial [Beamer y col., 1996].

5.4.2 Nutrición y ejercicio

Una adecuada ingesta de calcio y vitamina D, una buena nutrición, y un estilo de vida activo, dan como resultado un mayor pico de masa ósea y menos fracturas [Recker y col., 1996]. La deficiencia de calcio

causa hiperparatiroidismo secundario que puede producir un aumento de la resorción ósea y disminución de la masa ósea, particularmente en el hueso cortical [Boonen y col., 1997].

Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado un incremento de la masa ósea provocado por el ejercicio físico. El mecanismo de acción se estudió mediante estímulos mecánicos, y se observó que la señal se transmitía a través de los canalículos que unen los osteocitos con las células de la superficie ósea desencadenando una cascada de estímulos que terminaba con un aumento de la producción de prostaglandinas que son un potente agente anabólico regulador de la resorción ósea [Raisz, 2001].

No se ha constatado que el ejercicio físico tenga la capacidad de revertir la pérdida de masa ósea, pero sí se ha demostrado que la práctica de ejercicio físico moderado puede ser un método preventivo de dicha pérdida.

5.4.3 Hormonas sistémicas: Hace más de 50 años que se demostró que la pérdida de las hormonas sexuales en las mujeres posmenopáusicas era un factor crítico de pérdida de masa ósea [Albright, 1947]. Posteriormente se ha visto que otras hormonas sistémicas están también implicadas en la pérdida de masa ósea, como la PTH, la vitamina D, la hormona del crecimiento (HG)/ IGF y los glucocorticoides [Raisz, 2001].

- **Estrógenos:** La deficiencia de estrógenos es el primer factor patogénico en la osteoporosis posmenopáusica y probablemente también en la pérdida de masa ósea relacionada con la edad en los hombres.

Se han encontrado receptores estrogénicos en los osteoblastos, osteoclastos y osteocitos, así como en las células hematopoyéticas y vasculares adyacentes al hueso. El estrógeno inhibe la resorción ósea reduciendo la vida de los osteoclastos y alterando la producción de factores locales que regulan la formación osteoclástica. Por lo tanto, la deficiencia de estrógenos se manifiesta en un aumento del remodelado [Raisz, 2001].

- **Testosterona:** Los efectos de los andrógenos en el hueso se producen mediante la transformación de estos a estrógenos por la acción de la aromatasa y por su acción independiente que al unirse a los receptores androgénicos de las células óseas inhiben los osteoclastos [Hofbauer y col., 1999] y [Pederson y col., 1999].
- **Progesterona:** Se ha demostrado que la progesterona estimula el crecimiento óseo en tejido fetal y que las células óseas expresan receptores para la progesterona. Se ha demostrado también el efecto directo de la progesterona en el remodelado en humanos [Ikram y cols, 1999].
- **Hormona paratiroidea:** Se ha demostrado el rol patogénico de la PTH en la pérdida de masa ósea relacionado con la edad. En los individuos de edad avanzada se produce una disminución en la entrada de calcio, alterando la absorción del mismo, disminuyendo la entrada y síntesis de vitamina D. Como resultado tienen una deficiencia de calcio y un hiperparatiroidismo secundario. El déficit estrogénico relacionado con la edad también produce un aumento en los niveles de

PTH. El exceso de PTH está asociado con la pérdida de hueso cortical y con el aumento de la resorción endóstica e intercortical. [Silverberg y col, 1999].

La PTH provoca un incremento de la resorción ósea pero administrada de forma intermitente actúa como agente anabólico aumentando la formación ósea [Lindsay y col, 1997].

- **Vitamina D:** La deficiencia de vitamina D es muy común en la vejez, sobre todo en latitudes donde la luz solar no puede estimular la producción de vitamina D en la piel durante los meses de invierno. La deficiencia profunda de vitamina D provoca una alteración de la mineralización desarrollándose osteomalacia, pero las deficiencias leves se asocian con osteoporosis [Raisz, 2001].
- **Hormona del crecimiento (GH) e *Insulin-Like Growth Factor* (IGF):** El IGF-1 es un potente estimulador de la proliferación de los osteoblastos y de la síntesis de matriz ósea. Existe una disminución en la amplitud de la secreción pulsátil de GH y de los valores en circulación de IGF-1 relacionado con la edad. [Raisz, 2001].
- **Glucocorticoides :** Un exceso de glucocorticoides es la causa principal de la osteoporosis secundaria. Se hipotetiza que los glucocorticoides también podrían estar implicados en la osteoporosis primaria. Está descrito que las fluctuaciones diarias normales de los niveles de glucocorticoides son necesarias para el mantenimiento del crecimiento esquelético y el remodelado óseo. Se ha visto también que pacientes de edad avanzada con baja masa ósea tienen estos niveles de fluctuaciones alterados [Raisz, 2001].

5.4.4 Factores locales

- **Interacción osteoblasto/osteoclasto:** Alteraciones relacionadas con el sistema de regulación protagonizado por la OPG/RANKL/RANK (ya descritos anteriormente).
- **Sistema de la interleucina-1 en la osteoporosis:** La deficiencia estrogénica provoca un aumento del receptor 1 de la IL-1 (IL-1-R1) o una disminución del receptor señuelo de la IL-1 (IL-1-R2), que da como resultado un aumento de la resorción ósea [Raisz, 2001].

En la tabla 3 aparece un esquema de los principales factores de riesgo de osteoporosis (ver tabla 3).

FACTORES DE RIESGO DE OSTEOPOROSIS
Sexo femenino Entre un 20 y 25 por ciento de las mujeres sufren esta enfermedad tras la menopausia debido a la pérdida de estrógenos.
Envejecimiento
Raza blanca u oriental
Constitución delgada, escasa masa muscular y escoliosis
Menopausia precoz Desaparición de la menstruación antes de los 45 años, bien de forma natural o quirúrgica, y episodios prolongados de amenorrea.
Fracturas anteriores
Antecedentes familiares de la enfermedad (factor genético)
Enfermedades: Anorexia nerviosa, síndrome de Cushing, diabetes tipo 1, artritis reumatoide, enfermedades hepáticas crónicas, hipertiroidismo e hiperparatiroidismo.
Insuficiencia ovárica
<p>Factores relacionados con el estilo de vida</p> <ul style="list-style-type: none"> • <u>Déficit de calcio</u> • <u>Fumar más de 20 cigarrillos diarios</u> • <u>Abuso de alcohol y de café</u> • <u>Sedentarismo</u> • <u>Clima</u> Esta enfermedad es más frecuente en las zonas geográficas donde falta sol, posiblemente debido a que éste es necesario para sintetizar la vitamina D y mejorar la absorción intestinal del calcio. En los países nórdicos, por ejemplo, es más alta la incidencia de la fractura de fémur. • <u>Nivel socioeconómico</u> Un bajo nivel socioeconómico se asocia con una dieta insuficiente y una mayor morbilidad osteoporótica. Este factor cobra mayor importancia en las zonas urbanas que en las rurales. • <u>Uso prolongado de algunos medicamentos</u> como glucocorticoides, hormonas tiroideas y medicamentos anticonvulsivos.

Tabla 3: Principales factores de riesgo para la osteoporosis

5.5 DIAGNÓSTICO

En los últimos años la densitometría ósea se ha convertido en una técnica diagnóstica esencial para la valoración indirecta de la resistencia de los huesos y del riesgo de fractura individual. Esta técnica consiste en medir cuantitativamente los depósitos minerales asumiendo que éstos mantienen una composición química constante.

La densitometría ósea más difundida se valora mediante la **absorciometría radiológica de doble haz de rayos X (DXA)**. Este sistema consiste en que el haz de radiación de baja energía cede parte de esta energía al interactuar con la materia que atraviesa.

Los resultados de las mediciones con DXA se suelen ofrecer en forma de valores absolutos y relativos (comparados con valores de referencia). En los resultados absolutos, el contenido mineral (CMO) o masa ósea se ofrece en gramos (g) o miligramos (mg) equivalentes de hidroxapatita, si bien la forma de g/cm² que corresponde a la densidad mineral ósea (DMO) es la más difundida, ya que traslada el contenido mineral en el área proyectada (en dos dimensiones) por el hueso que es explorado [Del Río, 2004] (Figura 15).

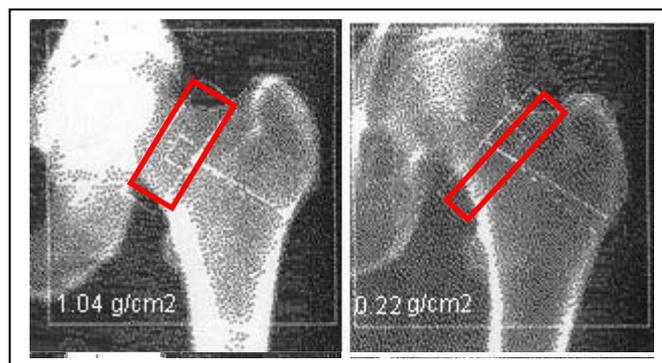


Figura 15: Imagen densitométrica de cuello de fémur. El cuadro rojo corresponde a la zona donde se realiza el cálculo de la densidad mineral ósea, valor que aparece a la parte inferior de las imágenes.

[<http://courses.washington.edu/bonephys/opbmd.html>]

Además de la DXA, en los últimos años se han desarrollado varios procedimientos para determinar la masa ósea. Por ejemplo, existe un procedimiento ecográfico que consiste en medir el rebote de los ultrasonidos en el hueso escafoides de la muñeca que es mucho más económico pero también menos exacto.

Existen métodos bioquímicos que permiten medir el *turnover* o remodelado óseo por métodos bioquímicos mediante la determinación de la glicerofosfatasa alcalina y de la hidroxiprolina y que se suelen hacer concomitantemente a la densitometría. En los últimos años se han identificado otros marcadores análogos de la hidroxiprolina (galactosil-hidroxilisina, piridinolina y la deoxipiridinolina) que permiten diagnosticar de forma bastante exacta la osteoporosis y su evolución.

Los marcadores de remodelado óseo son sustancias que pueden determinarse en sangre u orina y que reflejan la actividad del proceso del remodelado. Estos marcadores derivan de enzimas liberadas por las células óseas encargadas de la formación (osteoblastos) y de la resorción ósea (osteoclastos), o de fragmentos de colágeno óseo, que se liberan a la circulación durante el proceso de formación o de

resorción de la matriz ósea. La determinación de marcadores de remodelado no es útil para el diagnóstico de la osteoporosis, aunque puede complementar la información aportada por la medida de la DMO.

5.6 TRATAMIENTO DE LA OSTEOPOROSIS

El objetivo del tratamiento es prevenir el desarrollo de la osteoporosis y prevenir una mayor pérdida ósea para, de este modo, disminuir el riesgo de fracturas por osteoporosis. El tratamiento de la osteoporosis consiste en medidas farmacológicas y no farmacológicas. En la actualidad, existe una amplia gama de opciones terapéuticas y numerosos tratamientos farmacológicos seguros y eficaces que, según se ha demostrado, actúan rápidamente (en el transcurso de un año) y reducen el riesgo de fractura hasta un 50%. Es importante que la elección del tratamiento se ajuste a las necesidades médicas y al estilo de vida específico de cada paciente.

El manejo y el tratamiento de la osteoporosis pueden estar a cargo de médicos de diversas especialidades, entre ellas, médicos de cabecera, internistas, endocrinólogos, ginecólogos, reumatólogos y cirujanos ortopédicos.

5.6.1 Tratamiento no farmacológico

- **Medidas nutricionales.** La alimentación del paciente tiene una función importante en la prevención y el tratamiento. Una dieta equilibrada en aporte de calcio y vitamina D es imprescindible para mantener una buena salud ósea.

Una de las funciones de la vitamina D es estimular la absorción intestinal de calcio. El déficit subclínico de vitamina D es frecuente y puede contribuir al desarrollo de osteoporosis. Los depósitos de vitamina D dependen de la producción endógena derivada de la síntesis cutánea inducida por la exposición a la luz solar y de la ingesta de vitamina D en la dieta. En personas mayores es frecuente encontrar un déficit de ambos factores, de manera que es fundamental asegurar un aporte adecuado de esta vitamina.

- **Ejercicio físico.** Evitar el sedentarismo y realizar ejercicio de intensidad moderada que no implique sobrecarga mecánica, realizado con seguridad.
- **Evitar hábitos tóxicos.** Los hábitos tóxicos más ampliamente extendidos son sobre todo el tabaquismo y alcohol. Está demostrado que estos aceleran la pérdida de masa ósea por lo que se recomienda la supresión del consumo.
- **Evitar las caídas.** El riesgo de caídas aumenta con la edad debido a la pérdida de masa ósea que se produce por el envejecimiento. Para evitar las caídas es importante mantener la seguridad en el hogar y realizar un control exhaustivo de los medicamentos que puedan afectar al equilibrio.

En casos particulares, como en pacientes con alto riesgo de caída, puede ser útil el uso de protectores de cadera.

5.6.2 Tratamiento farmacológico

- **Terapia hormonal sustitutiva (THS).** Indicada para pacientes con osteoporosis posmenopáusica. Con la terapia hormonal sustitutiva se suministra al paciente un aporte hormonal de análogos de estrógenos mediante fármacos con la intención de evitar la deprivación hormonal por el cese de la actividad ovárica.
- **Calcitonina.** Aprovechando la capacidad antiresortiva que tiene esta hormona inhibiendo la actividad osteoclástica, se utiliza su administración como tratamiento farmacológico utilizando la hormona sintética o extraída de otros organismos como el salmón.
- **Los difosfonatos:** Los difosfonatos son compuestos análogos de los pirofosfatos inorgánicos que actúan inhibiendo la capacidad resortiva de los osteoclastos. El alendronato y el risedronato son los bifosfonatos más utilizados en la prevención y/o tratamiento de la osteoporosis.
- **Los SERMs (*selective estrogen receptor modulators*):** Los moduladores selectivos de estrógenos (SERMs) son una nueva categoría de fármacos utilizados para la prevención y tratamiento de la osteoporosis. Aparecieron como alternativa a la terapia hormonal sustitutiva muy controvertida en la actualidad debido al riesgo de cáncer de mama que conlleva la administración de estrógenos. Con la búsqueda de compuestos no esteroideos que llevaran una acción celular semejante aparecieron los moduladores selectivos de estrógenos (v.g: raloxifeno, toremifeno, raloxifeno, idoxifeno, etc.). Los SERMs no son compuestos antiestrogénicos sino inhibidores provistos de una doble acción: simultáneamente agonista y antagonista de los estrógenos dependiendo del tejido donde se acoplan a sus receptores específicos [Zárate, 2001]
- **La PTH (1-34) sintética:** La parathormona sintética PTH (1-34) se trata de un agente anabólico obtenido por tecnología genética (DNA recombinante) que estimula la formación de nuevo hueso, tanto cortical como trabecular, por lo que se ha demostrado que mejora la calidad del hueso: incrementa directamente la actividad osteoblástica y reconstituye la correcta microarquitectura [Zarate y col., 2003]
- **La vitamina D:** Las dos grandes posibilidades terapéuticas del sistema endocrino de la vitamina D en la osteoporosis son la vitamina D y el calcitriol o análogos como la 1α hidroxivitamina D, siempre acompañadas de los suplementos de calcio.

6 ESTATINAS EN EL REMODELADO OSEO

6.1 NATURALEZA QUÍMICA DE LAS ESTATINAS

Las estatinas son elementos competidores específicos del enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa. La mayoría de ellas existen como productos naturales (lactonas) que son prodrogas, sin capacidad de inhibir la HMG-CoA reductasa, pero que adquieren esta capacidad fácilmente por la acción de esterasas.

Las primeras estatinas utilizadas fueron de origen natural en tanto que varias de las más recientes son sintéticas, más poderosas y con diferente farmacocinética que sus predecesoras.

Las estatinas fueron todas seleccionadas por su capacidad de dirigirse al hígado y la mayoría son metabolizadas por las enzimas hepáticas.

Entre estas sustancias encontramos la lovastatina, la forma natural; la simvastatina y pravastatina que son una modificación química de la anterior; y la atorvastatina, fluvastatina y cerivastatina que son las formas sintéticas (Figura 16).

La mayoría de las estatinas como la lovastatina, simvastatina, mevastatina y fluvastatina son muy liposolubles y entran en las células fácilmente. Sin embargo, algunas de las estatinas más nuevas, como la pravastatina y la rosuvastatina son hidrosolubles y probablemente dependan de transportadores específicos de las células hepáticas, para su ingreso al hígado.

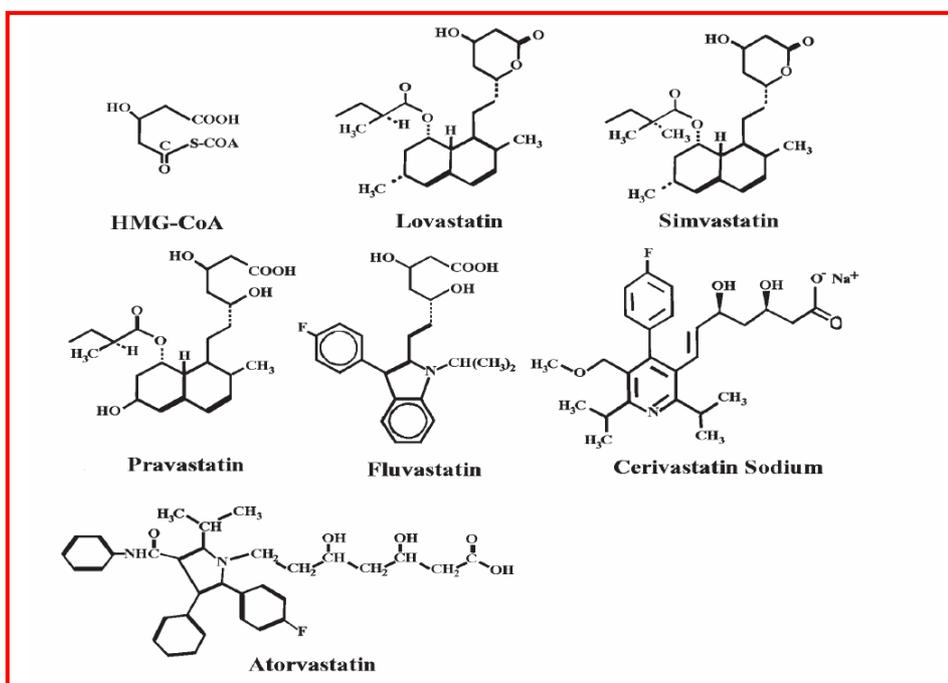


Figura 16: Estructura química de las estatinas y del HMG-CoA [Stancu y col, 2001].

6.2 FARMACOLOGÍA

La lovastatina, pravastatina y simvastatina son derivadas de la fermentación fúngica. La fluvastatina, atorvastatina y cerivastatina son enteramente sintéticas.

Por vía oral la biodisponibilidad es del 12%, atribuido a que sufren aclaración por la mucosa gastrointestinal y/o un importante metabolismo de primer paso. Son absorbidas rápidamente, alcanzando una concentración sérica máxima de 12.7-18.1 ng/ml (dosis oral de 20 mg) al cabo de 1-2 h. Los alimentos no modifican la absorción oral. Los efectos terapéuticos máximos se obtienen a partir de las 2 semanas de inicio del tratamiento.

La lovastatina, atorvastatina y simvastatina son metabolizadas en el hígado por el citocromo P450 (CYP 3A4) a derivados orto y parahidroxilados. El 70% de la actividad inhibidora de la HMG-CoA reductasa circulante se atribuye a los metabolitos activos, siendo eliminados mayoritariamente con las heces. La fluvastatina sufre metabolismo por el CYP2C9, y la pravastatina no sufre metabolismo hepático de ningún tipo.

La atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina y la pravastatina se administran como compuestos activos (forma ácida), en cambio la lovastatina y simvastatina son administradas en su forma inactiva (lactona), que tiene que sufrir una hidrólisis enzimática para generar la forma activa.

6.3 MECANISMO DE ACTUACIÓN DE LAS ESTATINAS

Todas estas sustancias son utilizadas para disminuir los niveles de colesterol y proporcionar una importante vía de abordaje en el tratamiento de la hiperlipidemia y arteriosclerosis.

Las estatinas reducen los niveles plasmáticos de colesterol total (60-65%) y de las lipoproteínas de baja densidad (LDL)(25- 40%). También disminuyen considerablemente los niveles de triglicéridos e incrementa, los de las lipoproteínas de alta densidad (HDL)(5-20%). Actúan inhibiendo la síntesis hepática de colesterol, al bloquear el enzima HMG-CoA reductasa implicado en la síntesis del ácido mevalónico, precursor metabólico del colesterol (Figura 17). Las estatinas compiten con el sustrato normal de este enzima uniéndose al centro activo. Al producirse la unión entre la enzima y las estatinas se produce un cambio conformacional en la estructura del enzima que inhibe la acción catalítica de este. La unión entre las estatinas y el enzima HMG-CoA reductasa es reversible y el enzima tiene una afinidad mucho más baja con las estatinas que con el sustrato inicial.

Como resultado de la disminución de la síntesis de colesterol hay un incremento del número de receptores de LDL tanto a nivel hepático como extrahepático, así como del catabolismo de LDL.

La inhibición de esta ruta de síntesis no solamente afecta al metabolismo del colesterol sino que tiene efectos “pleiotrópicos” en otras rutas biosintéticas.

Los efectos causados por las estatinas quedan divididos en dos categorías: la primera categoría implicada directamente con los lípidos y la segunda implicada en las vías de señalización intracelular.

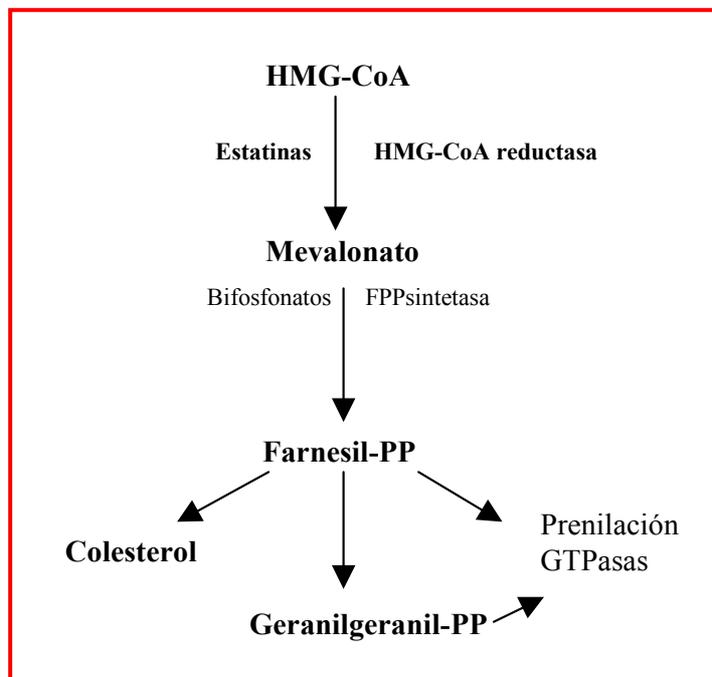


Figura 17: Síntesis de colesterol, vía común de estatinas y aminobifosfonatos. FPP. farnesil-pirofosfato, GTPas: glutamiltranspeptidasas (3)

6.4 MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS ESTATINAS EN EL HUESO

Hasta la actualidad, los fármacos existentes para el tratamiento de la osteoporosis por vía oral son agentes que actúan básicamente inhibiendo la resorción ósea, por lo que tienen una acción limitada para aumentar la masa ósea y así disminuir el riesgo de fracturas.

Al buscar nuevos fármacos que actuaran principalmente estimulando la formación ósea se enfocó la investigación hacia aquellos compuestos que incrementasen los factores de crecimiento. Algunos, como TGF y los FGFs, estimulan la proliferación osteoblástica, pero inhiben su diferenciación. En cambio, los miembros de la familia de las BMPs, incluyendo la BMP-2, incrementan la diferenciación osteoblástica. Más de 30.000 compuestos fueron evaluados en su capacidad de estimular el promotor del gen de BMP-2 realizando una transfección de un plásmido con el promotor de la BMP-2 delante del gen reportero de la luciferasa en una línea celular murina inmortalizada. Así, se comunicó por primera vez que las estatinas eran potentes estimuladores de la formación ósea *in vitro*, a través de este mecanismo [Mundy y col., 1999].

Con la simvastatina, la mevastatina y la atorvastatina (pero no la pravastatina) se encontró el mismo efecto que el encontrado anteriormente con la lovastatina. Asimismo, se vio que la cerivastatina tenía una actuación entre 10-100 veces más potente que las anteriores estatinas citadas. Todas ellas estimulan la transcripción de ARN mensajero de la BMP-2 y la expresión proteica de esta proteína en las células MG-63 de osteoblastos humanas, dos veces mayor que en condiciones basales.

Se ha descrito que las estatinas producen un incremento de la acumulación osteoblástica y de la formación de hueso nuevo en cultivo de células óseas murinas. La exposición transitoria las estatinas en cultivo de células óseas era suficiente para iniciar una cascada de formación ósea, probablemente inducida por una producción local de la proteína osteogénica BMP-2. Contrariamente, la pravastatina era incapaz de estimular la actividad promotora de la BMP-2 y por lo tanto no estimulaba la formación ósea en cultivo de células óseas murinas.

Estos resultados sugirieron que en general la acción de las estatinas en el hueso se produce mediante una estimulación inicial de la BMP-2 que dispara una cascada de factores que son responsables de los efectos subsecuentes sobre la formación ósea.

Posteriormente se demostró que la simvastatina producía un aumento de la formación ósea a través de la inducción de BMP-2 y fosfatasa alcalina (ALP) y por la acumulación de proteínas de la matriz ósea como el colágeno tipo 1 en cultivo de osteoblastos murinos MC3T3 [Maeda y col, 2001]

Al analizar el efecto de la simvastatina sobre la diferenciación de osteoblastos y adipocitos en cultivo primario de células estromales de la médula ósea de ratón (BMSCs) se observó que el tratamiento con la estatina estimulaba la expresión génica de osteocalcina, osteopontina y aumentaba significativamente la actividad de la fosfatasa alcalina. Estos resultados sugirieron que la simvastatina actuaba aumentando la diferenciación osteoblástica al mismo tiempo que inhibiendo la diferenciación de los adipocitos [Song y col., 2003].

En un estudio posterior se demostró la capacidad antiresortiva de la cerivastatina a través de la inhibición de la PTH. También se demostró la capacidad de provocar la inhibición de la prenilación de Rap1A en las poblaciones celulares medulares como consecuencia de la reducción de la actividad del HMG-CoA reductasa causada por las estatinas. De esta forma se demostró que las estatinas interferían en la ruta del mevalonato en los osteoclastos [Staal y col., 2003].

Posteriormente se demostró que la simvastatina aumentaba la expresión de las *Heat Shock Proteins* a través de la activación de la p38 MAP quinasa en las células osteoblásticas MC3T3 [Wang y col., 2003].

Estudios recientes observaron que la simvastatina producía un aumento en la expresión génica de BMP-2, vascular endothelial growth factor (VEGF), fosfatasa alcalina, colágeno tipo 1, sialoproteína ósea y osteocalcina sobre las células osteobásticas MC3T3-E1; pero en cambio producía una inhibición de la expresión génica de colagenasa-1 y colagenasa-3. En las células tratadas con simvastatina o cerivastatina se producía un aumento de la acumulación extracelular de proteínas como VEGF, osteocalcina, colagenasas digestivas y proteínas no colágenas. En cultivo celular se observó que las estatinas provocan un aumento de la mineralización [Maeda y col., 2004].

Posteriormente se ha investigado el efecto de las estatinas en el hueso trabecular y cortical de tibia, fémur y vértebras con ratas ovariectomizadas. Como conclusión del estudio destaca la capacidad de la simvastatina de producir un aumento moderado de formación del hueso cortical en las superficies óseas del periostio. El nuevo hueso se forma siguiendo la estructura lamelar normal y respetando la estructura primigenia del hueso. Además se observó que la simvastatina reducía la pérdida de hueso trabecular producida por la ovariectomía [Oxlund y col., 2004].

Recientemente se estudió el efecto de las estatinas sobre la migración de los osteoblastos en las células MC3T3-E1. A través del análisis de la expresión de genes claves en la migración osteoblástica como el *Platelet-derived growth factor* (PDGF), se observó que las estatinas actuaban como inhibidoras de la migración osteoblástica [Fukuyama y col., 2004].

7. CULTIVOS CELULARES

7.1. GENERALIDADES DEL CULTIVO CELULAR

La célula es la unidad funcional del ser vivo. Está limitada por una membrana proteico-lipídica que permite el paso de algunas sustancias e impide el de las otras, con lo que mantiene unas ciertas condiciones en el interior de la misma que hace posible su funcionamiento y supervivencia. La célula, como individuo perteneciente a un ser vivo, tiene sus necesidades satisfechas. Los requerimientos fisicoquímicos, nutritivos, de crecimiento y de defensa se realizan a través de mecanismos fisiológicos que procura el organismo completo. Hace unas decenas de años se demostró que las células podían extraerse de los tejidos y proliferaban *in vitro* en condiciones de esterilidad rigurosa. Para ello era necesario reproducir en el laboratorio las necesidades físicas (pH, osmolaridad), las necesidades nutritivas (aminoácidos, purinas y pirimidinas, carbohidratos, lípidos, vitaminas y coenzimas y sales), factores macromoleculares de crecimiento y medios de defensa frente a las infecciones. Era absolutamente necesario reproducir y mantener todos los requerimientos en valores exactos pero estos no se conocían de antemano. Por ese motivo los primeros cultivos celulares se realizaron en suero o en otros líquidos biológicos; pero estos medios a menudo fallaban, porque la complejidad molecular de los líquidos utilizados no permitía controlar el cultivo. El siguiente paso que se intentó dar fue la definición de nutrientes y necesidades físicas en lo que se llamaron los medios definidos, de los que hay una gran cantidad comercializados. Actualmente se avanza lentamente en el conocimiento de un tercer requerimiento que apareció al intentar sustituir totalmente el suero por los medios definidos químicamente: los factores de crecimiento. Estos factores han resultado ser difícilmente caracterizables debido, entre otras cosas, a sus pequeñas concentraciones en el suero, su actuación en conjunto (sinergismo) y sus interrelaciones moleculares entre ellos mismos o con nutrientes. Esto ha hecho que hoy en día todavía se utilicen medios con 5-10% de sueros animales indefinidos [Navarro, 1983].

Desde primeros de siglo la técnica de los cultivos celulares ha aportado un poderoso instrumento analítico para el estudio de fenómenos celulares, hasta entonces no utilizado. El mismo hecho de conseguir que las células de un organismo vivo sobrevivan y se multipliquen fuera de ese organismo ha permitido el conocimiento y, por lo tanto, el control de todos los requerimientos y mecanismos que funcionan *in vivo*. Los cultivos celulares permiten obtener cantidades suficientes de poblaciones de células homogéneas de manera reproducible, por lo que se pueden utilizar como modelos en el estudio de los mecanismos celulares. Pueden realizarse estudios sobre metabolismo celular, control de crecimiento, estudios sobre los mecanismos moleculares de diferenciación, requerimientos nutritivos, análisis clonal de los descendientes individuales de cada célula, etc.

Las diferencias de comportamiento que puede exhibir un mismo tipo celular *in vivo* e *in vitro* hace que no puedan extrapolarse sin más los resultados obtenidos *in vitro* a la situación real *in vivo*.

Los principales tipos de técnicas para cultivos celulares animales son tres: en medios semisólidos, en monocapa y en suspensión.

7.2 CULTIVO DE OSTEÓBLASTOS

7.2.1 Cultivo primario

Mills y colaboradores en 1979 fueron los primeros en describir el aislamiento de células humanas derivadas de hueso y posteriormente otros grupos describieron los métodos para el aislamiento de células óseas humanas con fenotipo osteoblástico específico. *Beresford* y colaboradores en 1986 demostraron que las células que crecían a partir de fragmentos de hueso trabecular desarrollaban un fenotipo osteoblástico. La expresión génica de algunos marcadores osteoblásticos en las células derivadas de hueso, se comparó con la expresión génica en fibroblastos de la piel y se encontraron grandes diferencias. De esta manera, las células derivadas de hueso trabecular tenían elevados niveles de actividad fosfatasa alcalina (ALP), y secretaban osteocalcina en los sobrenadantes celulares [*Beresford* y col., 1984]. *Robey* y *Termin* en 1985, usaron un nuevo método de aislamiento celular basado en un pretratamiento con colagenasa de los explantes óseos para eliminar todas las células, menos las situadas de forma adyacente al hueso. Con este método se pretendía obtener líneas osteoblásticas más puras [*Robey*, 1995].

7.2.2 Líneas celulares inmortalizadas derivadas de tumores

El osteosarcoma es un tumor formador de hueso y muchas líneas celulares derivadas de osteosarcoma se ha visto que son capaces de mantener su capacidad osteogénica al inyectarlos en animales y de mantener las características osteoblásticas en cultivo celular. Una de las características más importantes de su fenotipo transformado es que existe un acoplamiento entre proliferación y diferenciación, de forma que las células pueden expresar propiedades propias de las células diferenciadas sin perder su capacidad proliferativa (característica que no se da en tejido normal). Esta premisa confirma que la célula sigue expresando el mismo fenotipo que tenía antes de la transformación. Aun así, esto no excluye la expresión de aberraciones propias de las células tumorales produciendo anomalías reguladoras o cromosómicas.

La mayor ventaja de trabajar con células derivadas de osteosarcoma es la facilidad con la que pueden ser cultivadas, la relativa estabilidad genotípica y los pocos cambios que se producen en los múltiples pases del cultivo. Las desventajas de este modelo celular son la incertidumbre con respecto a la similitud con las células no transformadas y la posible deriva genotípica producida por la heteroploidía.

Otra desventaja importante de trabajar con células derivadas de tumores espontáneos es la pérdida de información respecto a la lesión que conduce a la transformación. Con los avances en biología celular en los conocimientos de la transformación celular se ha conseguido inmortalizar líneas celulares sanas con un fenotipo deseado. Estas líneas celulares comparten las ventajas de las células tumorales con la ventaja añadida que se ha podido controlar el proceso de transformación celular.

7.2.3 Líneas celulares clonadas

Existen gran cantidad de líneas celulares no tumorales establecidas que poseen características osteoblásticas obtenidas mediante la clonación de células de calota de rata o ratón. Las líneas celulares murinas o de roedores pueden devenir inmortales de forma espontánea mediante pases en cultivo celular.

III. Objetivos

OBJETIVO SUBESTUDIO I- Análisis del cultivo primario de osteoblastos humanos y la línea tumoral MG-63 como modelo para el estudio de patologías metabólicas óseas y el efecto de factores reguladores y de fármacos en el hueso.

OBJETIVO SUBESTUDIO II- Cultivo primario de osteoblastos de pacientes con osteoporosis posmenopáusicas. Estudio de la proliferación celular y de la expresión génica del sistema de regulación OPG/RANKL, el factor de transcripción Cbfa1 y el factor de crecimiento BMP-2 implicados en la osteoblastogénesis, y el colágeno tipo 1 y la osteocalcina implicados en la síntesis de la matriz ósea.

OBJETIVO SUBESTUDIO III- Efecto de la simvastatina y la atorvastatina en osteoblastos humanos primarios normales y la línea celular MG-63. Estudio de la proliferación celular y de la expresión génica del factor de crecimiento BMP-2 implicado en la osteoblastogénesis, y del colágeno tipo 1 y la osteocalcina implicados en la síntesis de la matriz ósea.

OBJETIVO SUBESTUDIO IV- Cultivo primario de osteoblastos de varones con osteoporosis idiopática. Estudio de la proliferación celular y de la expresión génica del colágeno tipo 1 y la osteocalcina implicados en la síntesis de la matriz ósea.

IV. Pacientes y métodos

1. PACIENTES

1.1 PACIENTES SUBESTUDIO II

Se incluyeron en el estudio un total de 22 mujeres atendidas en el Hospital del Mar. Todas ellas fueron voluntarias y firmaron un consentimiento informado.

1.1.1 Criterios de inclusión

- Tener realizada una densitometría ósea.
- Edad entre 50 y 80 años, ambos inclusive.
- Para poder garantizar la homogeneidad de la muestra poblacional, en cuanto a origen geográfico, todas las mujeres seleccionadas debían asegurar tres generaciones anteriores del mismo origen.

1.1.2 Criterios de exclusión

- Enfermedades endocrino-metabólicas que pudieran alterar el metabolismo mineral y óseo, tales como enfermedad de Paget, hiperparatiroidismo o menopausia temprana por causas hormonales.
- Antecedentes de gastrectomía o malabsorción.
- Antecedentes de ingesta de fármacos como corticoesteroides o anticonvulsivantes por un periodo de más de 6 meses en cualquier periodo, y en ninguna cantidad en los últimos 6 meses.
- Consumo de alcohol por encima de 60 g/día.
- Tratamientos previos realizados durante al menos 6 meses en cualquier periodo, que sean capaces de alterar el metabolismo mineral u óseo, y en ninguna cantidad en los últimos 6 meses.
- Mujeres que estén recibiendo tratamiento hormonal sustitutivo o difosfonatos.
- Alteraciones a nivel de columna lumbar que no permitieran la medición de la masa ósea en al menos 2 vértebras comprendidas entre L1-L4.
- Los expresados en la legislación vigente.

Los datos de filiación, edad, peso, altura, año de instauración de la menopausia, tipo de menopausia (natural o quirúrgica), lugar y fecha de nacimiento y lugar de nacimiento de padres y abuelos, se obtuvieron mediante cuestionario.

1.1.3 Sujetos de estudio

- **Casos (n=9):** Pacientes posmenopáusicas sometidas a reemplazo quirúrgico de prótesis de rodilla, que presentaron osteoporosis determinada por la densidad mineral ósea.
- **Controles (n=12):** Pacientes sin patología ósea metabólica asociada, que precisaron de intervención ortopédica y de las que se pudo disponer de un hueso residual esponjoso histológicamente normal. No osteoporosis confirmada por densitometría ósea.

1.2 PACIENTES SUBESTUDIO III

1.2.1 Línea celular MG-63

Las MG-63 son una línea celular de osteosarcoma humano de un niño de 14 años adquiridas en la ATCC (*American Type Culture Collection*), referencia CRL-1427.

1.2.2 Osteoblastos primarios humanos normales

El “pool” de osteoblastos primarios se obtuvo de 3 muestras procedentes de intervenciones quirúrgicas de reemplazo por prótesis de cadera de dos mujeres y un hombre de entre 69 y 74 años, realizadas en el Hospital de Mar de Barcelona, con previo consentimiento informado del paciente.

1.3 PACIENTES SUBESTUDIO IV

Estudio caso-control apareado por edad.

1.3.1 Criterios de inclusión

- Pacientes varones afectados de osteoporosis idiopática menores de 60 años.

1.3.2 Criterios de exclusión

- Pacientes que hubieran recibido quimioterapia o fármacos previos que pudieran interferir en el metabolismo óseo.
- Pacientes con osteoporosis secundarias, alcoholismo severo, insuficiencia renal crónica.
- Los expresados por la legislación vigente.

1.3.3 Sujetos de estudio

- **Casos (n=14):** Pacientes varones con osteoporosis idiopática, confirmada mediante estudio histológico.
- **Controles (n=17):** Pacientes sin patología ósea metabólica asociada ni antecedentes patológicos de interés, intervenidos quirúrgicamente por lesiones secundarias a traumatismo osteoarticular.

Todos los sujetos del estudio fueron informados por escrito de los objetivos del mismo y con anterioridad a su inclusión se les solicitó autorización escrita. A los pacientes con sospecha clínica de osteoporosis idiopática, y que cumplían los criterios de inclusión, se les ingresó durante 24 horas en el Hospital del Mar para realizarles un estudio que incluía: densitometría ósea, estudio bioquímico del remodelado óseo, extracción de sangre periférica y biopsia ósea transilíaca, previo marcaje con tetraciclinas. La biopsia transilíaca permitió confirmar el diagnóstico de osteoporosis.

2. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

2.1 PRÓTESIS DE RODILLA Y CADERA

Para la realización del subestudio II y III los osteoblastos primarios se obtuvieron de muestras procedentes de intervención quirúrgica de pacientes entre 50 y 80 años de edad, realizadas en los quirófanos del Hospital del Mar por el servicio de Traumatología. Estas muestras procedían de rodillas (subestudio II) y caderas (subestudio III) obtenidas como consecuencia de un reemplazo por prótesis. En el mismo quirófano, las muestras óseas se trocearon y se depositaron en recipientes de plástico estériles que contenían medio de cultivo *Dubelcco's modified Eagle médium* (DMEM) (Gibco, Gran Island, New York, USA).

2.2 BIOPSIA DE CRESTA ILÍACA

Para la realización del subestudio IV los osteoblastos primarios se obtuvieron de muestras procedentes de biopsias de cresta ilíaca. Las biopsias transilíacas se obtuvieron mediante el método estándar usando un trocar de Bordier de 7mm de diámetro interno. El cilindro obtenido se escindió longitudinalmente mediante la técnica descrita por *Bartl y col.*, 1982. Una mitad de la biopsia se utilizó para cultivo de osteoblastos y la otra se procesó con fines diagnósticos (Figura 1).

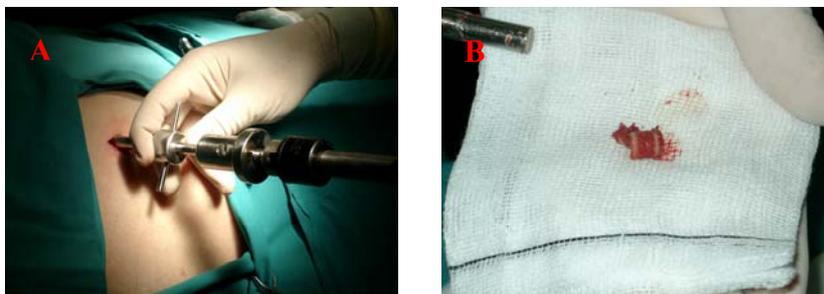


Figura 1: **A:** Imagen del del proceso de extracción de la biopsia de cresta ilíaca. **B:** Cilindro de hueso extraído en la biopsia de cresta ilíaca. En la parte exterior se observa el hueso cortical y en la parte central el hueso trabecular.

3. CULTIVO CELULAR

3.1 CULTIVO PRIMARIO DE OSTEÓBLASTOS

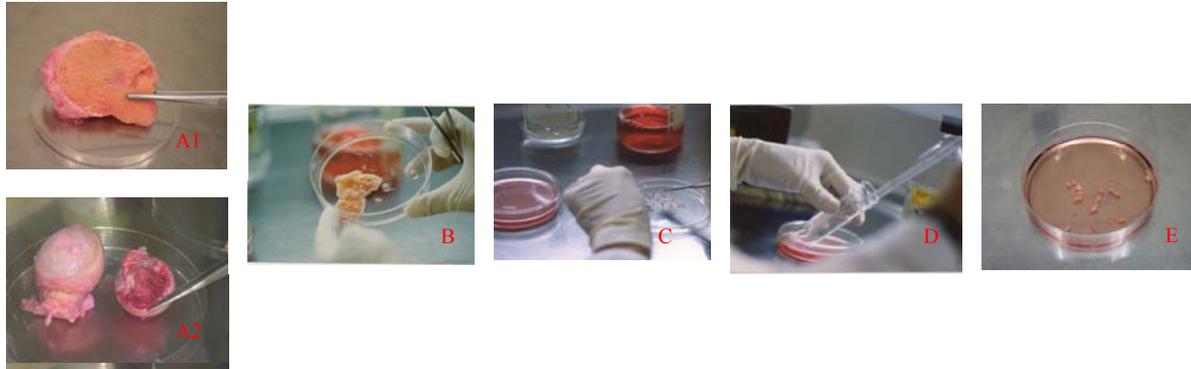


Figura 2: Imágenes secuenciales del proceso del cultivo primario de osteoblastos humanos. A1: Corte longitudinal de rodilla. En la parte central se observa el hueso trabecular y en la capa concéntrica que la envuelve se observa hueso cortical. La fina lámina rosa periférica corresponde al tejido cartilaginoso. A2: Imagen de la cabeza de fémur. A la derecha se observa la parte interior del hueso donde se encuentra el hueso trabecular. B: Fragmento de hueso trabecular en la placa de Petri. C: Fragmentos de hueso trabecular troceados mecánicamente para la formación de los explantes individualizados. D: Lavados de los explantes óseos por agitación mecánica para eliminar restos de células hematopoyéticas y células adherentes de la médula ósea. E: Imagen de los explantes en la placa de Petri cubiertos con DMEM.

La obtención de las células osteoblásticas se realizó siguiendo el método de *Nacher y col*, 1994. Una vez obtenida la muestra de hueso, se separó el hueso trabecular del cortical y de la médula ósea mediante el material quirúrgico apropiado. Esta operación se efectuó de forma macroscópica. El hueso trabecular se cortó en fragmentos o explantes de un tamaño aproximado de entre 1 y 2 mm. Los explantes se lavaron repetidamente en tampón fosfato (PBS) estéril con el fin de eliminar restos de células hematopoyéticas y células adherentes de la médula ósea. A continuación, los explantes se depositaron sobre una placa de Petri de 10 cm de diámetro con 20 ml de medio de cultivo DMEM (4.5 g/l de glucosa) suplementado con piruvato (1mM), glutamina (2mM), penicilina (100 UI/ml), estreptomycin (100 UI/ml) y con un 10% de suero bovino fetal (FCS, *fetal calf serum*)(Figura 2).

Los explantes se incubaron a 37°C y un 5% de CO₂ en atmósfera húmeda cambiando el medio dos veces por semana. En una semana, aproximadamente, se visualizó la migración de células adherentes sobre la placa de Petri.

Cuando las células tapizaban la totalidad de la superficie de la placa, se consideró que ya estaba formada la monocapa de células y el cultivo se encontraba confluyente procediéndose al subcultivo de estas células en frascos de cultivo de 75 cm².

3.2 CULTIVO DE LA LÍNEA MG-63

Las células MG-63 crecieron en DMEM suplementado con piruvato (1mM), glutamina (2mM), penicilina (100U/ml), estreptomicina (100U/ml), fungizona (1.5mg/ml) con un 10% de suero bovino fetal (FCS, *fetal calf serum*), a 37°C de temperatura en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ (Figura 3).

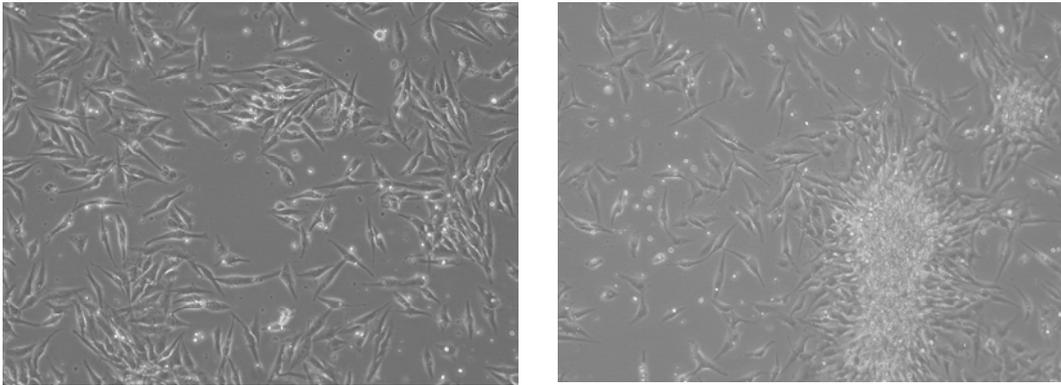


Figura 3: Imagen microscópica del cultivo de las células MG-63. 100X.

3.3 CULTIVO PRIMARIO DE FIBROBLASTOS

El cultivo primario de fibroblastos se realizó a partir de piel humana. Las muestras de piel se limpiaron extrayendo todo el tejido graso y los vasos sanguíneos que podían contener.

Una vez limpia, la piel se cortó en explantes de 1mm de diámetro aproximadamente, se lavaron ligeramente con PBS y con la ayuda de la pipeta Pasteur se depositaron sobre la base de un frasco de cultivo celular de 25 cm² previamente humedecido con DMEM suplementado con penicilina (100 UI/ml), estreptomicina (100 UIg/ml) y un 10% de FCS. Se incubaron a 37°C, un 5% de CO₂ y atmósfera húmeda, cambiando el medio dos veces por semana.

Pasados de 3 días a una semana, empezaron a migrar una capa de células epiteliales alrededor de los explantes. Al mismo tiempo, o bien posteriormente, empezaron a proliferar los fibroblastos que se adherían a la superficie del frasco de cultivo y tenían un aspecto fusiforme que los diferencia fácilmente de las células de tipo epitelial.

Una vez los fibroblastos migraron de los explantes de piel y estuvieron confluyentes se procedió a su subcultivo.

3.4 RECUENTO CELULAR



Figura 4: Cámara de Neubauer

Se utilizó como método de recuento celular la cámara de Neubauer (Figura 4), con el objetivo de 10 aumentos, que efectúa el recuento de las células en un área de 1mm² definida por las triples líneas paralelas de la cámara. El número de células por mililitro de suspensión permitió calcular el número de células total.

3.5 CRIOPRESERVACIÓN CELULAR

La congelación de células de cada una de las líneas celulares utilizadas en los experimentos permitió la realización de experimentos continuados en el tiempo y la reproductividad de dichos experimentos. La congelación celular se realizó en DMEM que contenía el 50% de FCS. El FCS provee a las células de factores de crecimiento y actúa como adyuvante para la protección contra el daño celular que se puede producir durante el almacenamiento criogénico. Se añadió también un 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) en el medio, que es un crioprotector que penetra dentro del citoplasma y evita la formación de cristales que se producirían como consecuencia de la fracción acuosa de éste, ya que la formación de cristales en el interior de las células produciría su lisis.

La suspensión celular con el crioprotector se congeló a una temperatura de -80°C mediante una disminución gradual de la temperatura para preservar la viabilidad celular. Si las células tenían que mantenerse congeladas durante periodos prolongados se creyó conveniente su inmersión en nitrógeno líquido para preservar las estructuras celulares.

3.6 DESCONGELACIÓN DE CÉLULAS

La descongelación de las células tiene que ser rápida. El criotubo que estaba sumergido en nitrógeno líquido se traspasó a un bloque de hielo para mantenerlo congelado. Rápidamente se sumergió en un baño a 37°C y cuando estuvo descongelado se recogió la suspensión celular y se puso rápidamente en medio de cultivo a 37°C. La suspensión celular se centrifugó para eliminar el crioprotector (DMSO) que es altamente tóxico para las células.

Se repartieron las células en frascos con DMEM con el 10% de FCS, y pasadas 24 horas se realizó un control al microscopio del porcentaje de supervivencia celular.

El porcentaje de supervivencia medio que se obtuvo a lo largo de los experimentos realizados en este estudio fue de entre el 75% y el 80%.

4. CARACTERIZACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES

4.1 MORFOLOGÍA CELULAR

Durante todo el proceso de cultivo, las células fueron controladas observándolas al microscopio óptico y descartando la posible contaminación por levaduras, hongos o bacterias.

Con los objetivos de 10 y 20 aumentos se observó completamente todo el área de cultivo para controlar el correcto crecimiento de las células y su desarrollo (Figura 5).

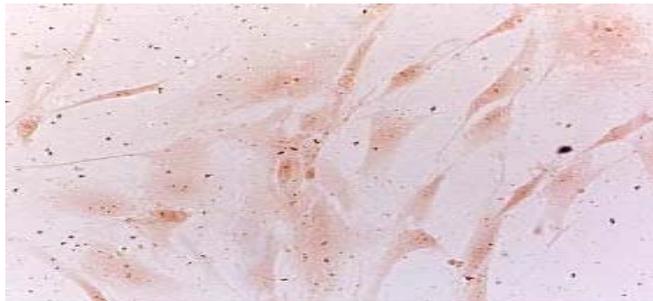


Figura 5: Cultivo primario de osteoblastos humanos

4.2 HISTOQUÍMICA PARA LA DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA ALCALINA

Para la detección de la actividad fosfatasa alcalina se distribuyeron 400.000 células sobre cubreobjetos esterilizados y depositados sobre placas de 35 mm de diámetro con DMEM suplementado y un 10% de FCS. Las células se trataron con vitamina D 10^{-8} M (Roche), vitamina K 10^{-8} M (Sigma) y 100mg/ml de ácido ascórbico (Sigma) durante 72 horas. El cultivo se lavó dos veces con 2 ml de PBS y a continuación las células se fijaron con 2 ml de etanol frío al 95% durante 5 minutos a 4°C.

Las células fijadas se incubaron en una solución de contraste (ácido alfa naftilfosfato al 0.1% en tampón Tris 0.1M pH=10 (Sigma) con *Fast Blue RR* (Sigma) para contrastar), previamente filtrada, entre 30 minutos y 4 horas a temperatura ambiente. Como control positivo se utilizó un corte histológico de riñón. Las células que presentaban actividad fosfatasa alcalina positiva quedaban teñidas de negro bajo la luz del microscopio óptico (Figura 6).

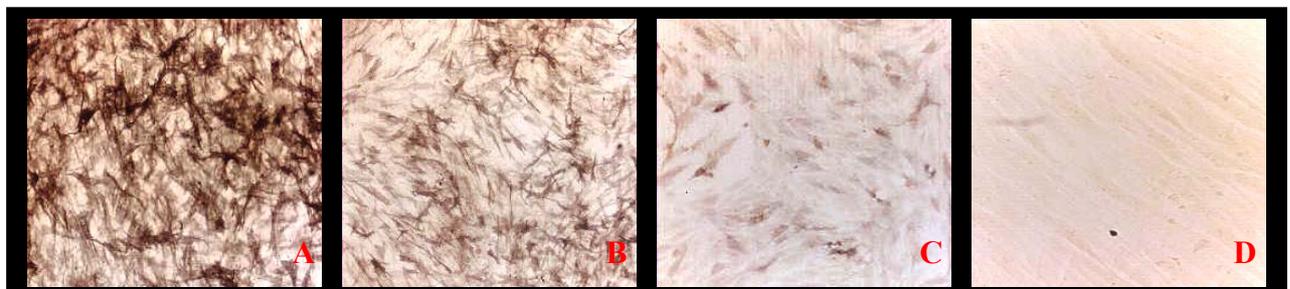


Figura 6: Detección citoquímica de la actividad fosfatasa alcalina. Imagen de microscopía óptica (100x) de la actividad fosfatos alcalina de los diferentes tipos celulares utilizados. Se han utilizado los fibroblastos como control negativo. **A:** línea de osteoblastos humanos. **B:** "pool" de osteoblastos primarios. **C:** línea MG-63. **D:** fibroblastos.

4.3 DETECCIÓN CUALITATIVA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE OSTEOCALCINA

4.3.1 Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario (ADNc)

El método de extracción de ARN total utilizado se basó en una lisis celular mediante una solución con una elevada concentración de tiocinato de guanidina, que es un potente inhibidor de las ribonucleasas, y posterior aislamiento del ARN con fenol a pH ácido. La solución utilizada fue *TriReagent* (Molecular Research Centre).

El primer paso de la extracción de RNA fue la homogenización donde se aplicó la solución *TriReagent* sobre la monocapa de células en la placa de cultivo provocándose la lisis celular. Se dejó actuar el *TriReagent* durante cinco minutos para disociar los complejos nucleoproteicos. Seguidamente se realizó la separación de las fases mediante la adición de cloroformo. De esta forma después de la centrifugación la mezcla quedó dividida en tres fases, una fase orgánica (fenol-cloroformo), una interfase y una fase acuosa. La porción de ARN de la muestra se encontraba exclusivamente en la fase acuosa de la misma mientras que las proteínas y DNA se situaron en la fase orgánica e interfase. Posteriormente se procedió a la precipitación del ARN mediante la adición de isopropanol. Finalmente después de un lavado del ARN con etanol se procedió a resuspender el “pellet” de ARN con agua.

Se evaluó el estado de degradación ARN obtenido mediante un gel de agarosa y se cuantificó mediante la lectura espectrofotométrica a 260 nm.

La retrotranscripción se realizó utilizando 900 ng del ARN total. En un volumen de 6 µl, este ARN, junto con 25 ng/ml del *oligo (dT)₁₂₋₁₈ primer* (GibcoBRL), se incubó a 70°C durante 10 minutos e inmediatamente se colocó en hielo. Después se añadieron: 50 mM de Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂, 10 mM de dithiothreitol, 1mM de cada uno de los dNTPs y 100 unidades de la enzima *SuperScript™ II Rnase H Reverse Transcriptase* (GibcoBRL), en un volumen final de 10 µl. La reacción de extensión se realizó a 42°C durante 50 minutos y se inactivó a 70°C durante 10 minutos.

4.3.2 PCR Osteocalcina (BGP)

La reacción de PCR fue realizada en un volumen total de 50 µl que contenía 5µl de cDNA (dilución 1/10 de la mix de la RT), 20mM Tris-HCl, 50mM MgCl₂, 200µM de cada desoxi-NTP, 0.3mM de cada cebador específico (sentido: 5'-TCA CAC TCC TCG CCC TAT T-3', región específica del exón 1 y antisentido: 5'- CGA TGT GGT CAG CCA ACT-3', región específica del exón 4), y 0.03U/µl TaqDNA polimerasa (GibcoBRL)

Se realizó la reacción de PCR de 40 ciclos con desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 58°C durante 40 segundos y polimerización a 72°C durante 90 segundos. Como control endógeno de la reacción de PCR, se utilizó la PCR de la β-actina con los cebadores sentido y antisentido (sentido: 5'-

CCT AGA AGC ATT TGC GGT GCA CGA TG T-3', y antisentido: 5'- CCT AGA AGC ATT TGC GGT GCA CGA TG -3') bajo las mismas condiciones.

El producto amplificado se analizó en un gel de agarosa al 1%, marcando el DNA con Bromuro de Etidio (BrEt) y se visualizó bajo una fuente de luz ultravioleta.

Se utilizó cDNA de fibroblastos humanos como control negativo ya que está descrito que este tipo celular no sintetiza osteocalcina (Figura 7).

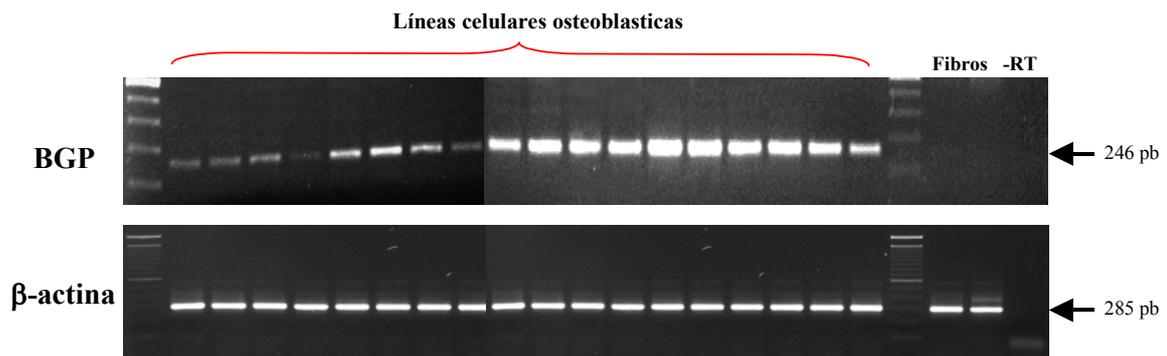


Figura 7: Análisis de la RT-PCR de los transcritos del gen de la osteocalcina (BGP). Imagen densitométrica de la electroforesis en gel de agarosa de la amplificación por PCR del gen de la osteocalcina. La banda de 246 pb corresponde al tamaño del fragmento amplificado del gen de la osteocalcina. Se utilizó la β-actina como control endógeno de la reacción y cDNA de fibroblastos humanos como control negativo de la PCR.

5 DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE LA TINCIÓN CON *TRYPAN BLUE*

El *Trypan blue* es una tinción utilizada para determinar el conteo de las células viables *in vitro* de una suspensión celular. Este método se basa en el principio de que las células viables (vivas) no dejan entrar el colorante dentro de la célula, mientras que las no viables (muertas) tienen la membrana citoplasmática desestructurada o rota de manera que permiten que el colorante permee dentro de la célula.

Se prepara una suspensión celular y se añade el mismo volumen de la solución de *Trypan blue* (0.4%) y pasados 15 minutos de incubación se realiza el conteo del número de células viables (no teñidas) en una cámara de Neubauer. Se determina la densidad celular en la suspensión madre teniendo en cuenta el factor de dilución.

6 CURVAS DE PROLIFERACIÓN CELULAR

La medida del crecimiento celular refleja el cambio en el número de células durante un periodo de tiempo. La forma de la curva de crecimiento es característica de cada tipo celular y permite obtener el tiempo de duplicación celular, que es el tiempo que tarda el cultivo en duplicar el número de células durante la fase exponencial. Al principio del cultivo, las células pasan por un periodo de latencia (fase “lag”) en el que no se dividen, debido a que se encuentran en un periodo de adaptación. Una vez pasado este periodo, las células empiezan a proliferar de una forma exponencial (fase “log”) hasta que dejan de dividirse al llegar a la confluencia del cultivo. En esta última fase que se llamada estacionaria o “plateau” se da una inhibición del crecimiento por densidad.

Los experimentos para la medición de la proliferación celular se realizaron en todos los casos en el primer pase del cultivo primario: Se distribuyeron 20.000 células por pocillo en una placa de 24 pocillos con 1ml de DMEM suplementado y 10% FCS. Se realizó un primer recuento celular a las 48 horas, lavando los pocillos con PBS dos veces y añadiendo 500µl de tripsina por pocillo. Se hizo el recuento con la cámara de Neubauer y se calculó el número de células por pocillo. Los siguientes recuentos se realizaron los días 4, 6, 8, 11, y 14. Los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como media +/- desviación estándar (DS).

7 ENSAYO DE PROLIFERACIÓN MEDIANTE ELISA DEL BrdU

Para un ensayo de ELISA del 5-Bromodeoxyuridine (BrdU) se utilizó un kit (*Cell Proliferation ELISA, BrdU*) colorimétrico (*Roche Diagnostics, Germany*). Esta técnica se basa en la incorporación de una pirimidina análoga marcada coloriméricamente (BrdU) en lugar de la timidina en la síntesis de DNA de las células proliferantes.

Las células son cultivadas en placas de 96 pocillos a una densidad de 10.000 células/pocillo a 37°C durante 24, 48, 72 y 96 horas (tras previa sincronización de las células durante 48 horas) añadiendo el tratamiento correspondiente cada 24 horas. De esta forma durante las 24 horas últimas del ensayo el BrdU se va incorporando en el DNA de las células proliferantes. Se realizaron dos tipos de control negativo; pocillos con células sin tratamiento donde no se añadió BrdU y pocillos sin células donde se añadió BrdU, que sirvieron para detectar uniones inespecíficas de los reactivos de la inmunodetección. Después de retirar el medio de cultivo se fijaron las células y el DNA se desnaturalizó en un solo paso con la solución FixBenat. El anti-BrdU-POD se unió al BrdU incorporado y los complejos formados se detectaron con la reacción con el sustrato específico y se cuantificó con la medida de la absorbancia a 450nm.

7.1 TRATAMIENTO

- **Subestudio IV**

- Condiciones basales:** DMEM con 0.1% de BSA
- FCS:** DMEM + 10% de FCS
- Simvastatina:** Simvastatina 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M y 10^{-9} M + 0.1% de BSA
- Simvastatina:** Simvastatina 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M y 10^{-9} M + 10% de FCS
- Atorvastatina:** Atorvastatina 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M y 10^{-9} M + 0.1% de BSA
- Atorvastatina:** Atorvastatina 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M y 10^{-9} M + 10% de FCS

8 TEST DE VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE ELISA DEL MTT

Para realizar el test de viabilidad celular se utilizó un kit de ELISA (*Cell proliferation kit I (MTT)*) colorimétrico (*Roche Diagnostics, Germany*). El principio de el análisis se basa en la capacidad que tienen las células vivas de romper el sustrato amarillo tetrazolium salt MTT en cristales púrpuras de formazan mediante un enzima mitocondrial (Figura 8). En esta reducción celular están involucrados los cofactores de nucleótidos pirimidínicos NADH y NADPH. Los cristales formados son solubilizados para poder cuantificarlo mediante espectrofotometría. Las células son cultivadas en placas de 96 pocillos a una densidad de 10.000 células/pocillo a 37 °C en un volumen final de medio de cultivo de 100µl. Después de la sincronización de las células durante 48 horas se incubaron las células durante 24 horas con todas las concentraciones de las dos estatinas testadas. Posteriormente se añadieron 10µl del reactivo MTT y se incubó durante 4 horas a 37°C para que la reacción por parte de las células viables tuviera lugar. Pasadas las horas se añadió en el medio 100µl del solubilizador *overnight* para disolver los cristales de formazan. Finalmente se realizó la lectura espectrofotométrica a 550nm. Y 600nm.

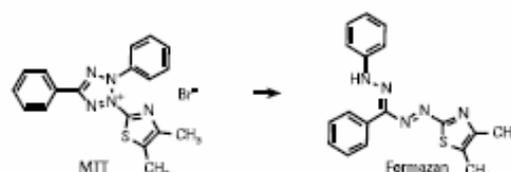


Figura 8: Metabolización del MTT a formazan por parte de las células viables

8.1 TRATAMIENTO

- **Subestudio IV**

- Condiciones basales:** DMEM con 0.1% de BSA
- FCS:** DMEM + 10% de FCS
- Simvastatina:** Simvastatina 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M y 10^{-9} M + 0.1% de BSA
- Simvastatina:** Simvastatina 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M y 10^{-9} M + 10% de FCS
- Atorvastatina:** Atorvastatina 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M y 10^{-9} M + 0.1% de BSA
- Atorvastatina:** Atorvastatina 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M y 10^{-9} M + 10% de FCS

9 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE OPG, RANKL, COL1A1, osteocalcina, Cbfa1 Y BMP-2

9.1 TRATAMIENTO

Los experimentos para la determinación de la expresión génica se realizaron en todos los casos en el primer subcultivo.

Las células se distribuyeron en placas de 6 pocillos a una densidad de 200.000 células por pocillo y fueron incubadas en DMEM suplementado y un 10% de FCS. A las 48 horas, el cultivo se encontraba subconfluyente. En este estado de subconfluencia, se añadió DMEM suplementado y un 0.1% de seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma, St. Louis, USA) al 0.1% y sin FCS, para sincronizar el ciclo celular y se dejó incubar durante 48 horas. Una vez pasado este tiempo, los osteoblastos se incubaron en las siguientes condiciones:

- **Subestudio II**
 - a) **Condiciones basales:** DMEM con 0.1% de BSA
 - b) **FCS:** DMEM + 10% de FCS
 - c) **Vitamina D₃:** DMEM con 0.1% de BSA al + vitamina D₃ 10⁻⁸M (Roche)
 - d) **17β-estradiol:** DMEM con 0.1% de BSA al + 17β-estradiol 367nM (Sigma)
- **Subestudio III**
 - a) **Condiciones basales:** DMEM con 0.1% de BSA
 - b) **FCS:** DMEM + 10% de FCS
 - c) **Simvastatina:** Simvastatina 10⁻⁶M, 10⁻⁷M, 10⁻⁸M y 10⁻⁹M + 0.1% de BSA
 - d) **Simvastatina:** Simvastatina 10⁻⁶M, 10⁻⁷M, 10⁻⁸M y 10⁻⁹M + 10% de FCS
 - e) **Atorvastatina:** Atorvastatina 10⁻⁶M, 10⁻⁷M, 10⁻⁸M y 10⁻⁹M + 0.1% de BSA
 - f) **Atorvastatina:** Atorvastatina 10⁻⁶M, 10⁻⁷M, 10⁻⁸M y 10⁻⁹M + 10% de FCS
- **Subestudio IV**
 - a) **Condiciones basales:** DMEM con 0.1% de BSA
 - b) **Vitamina D₃:** DMEM con 0.1% de BSA al + vitamina D₃ 10⁻⁸M (Roche)

Se dejaron incubar 24 horas y seguidamente se procedió a la extracción de ARN.

9.2 EXTRACCIÓN DE ARN Y SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO (ADNc) (Ver apartado 3.3.1)

9.3 PCR CUANTITATIVA (*Real Time PCR*)

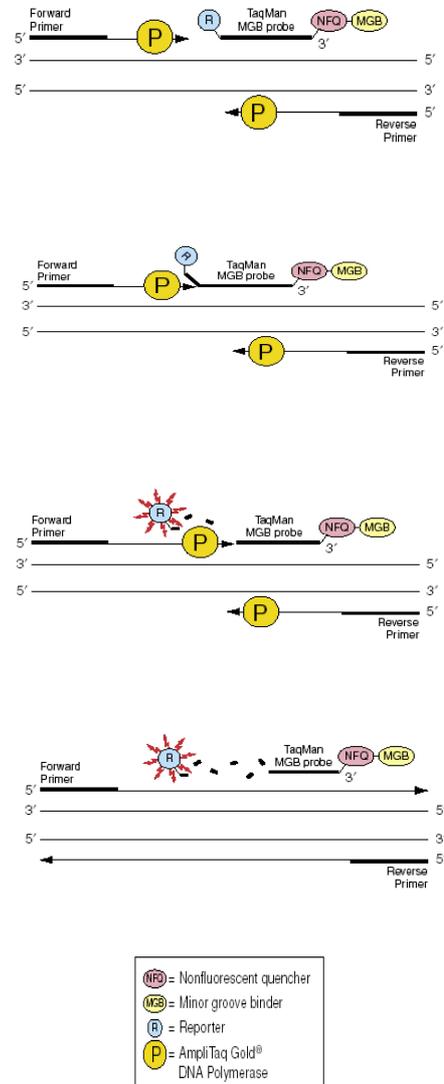


Figura 9: Esquema de la reacción de PCR a tiempo real utilizando una sonda Taqman (Real Time PCR).

Para estudiar con elevada precisión el efecto de distintas hormonas, citoquinas y fármacos sobre la expresión génica de la osteoprotegerina (OPG), el ligando del receptor activador del factor nuclear κ B (RANKL), el polipéptido α 1 del colágeno tipo 1 (COL1A1), la osteocalcina (BGP), la *bone morphogenetic protein-2* (BMP-2) y el Cbfa1 en osteoblastos humanos, las amplificaciones por PCR de

los ADNc se realizaron bajo condiciones cuantitativas, utilizando la técnica de PCR a tiempo real (*Real time PCR*) específicos de cada gen y la β -actina (control endógeno de la reacción de PCR).

La reacción de PCR a tiempo real consiste en monitorizar el progreso de la reacción de PCR a medida que va ocurriendo, desde el principio hasta el final. La tecnología TaqMan utiliza unas sondas fluorogénicas que permiten la detección de los productos de PCR específicos a medida que se van sintetizando (Tabla 1). En esta técnica, la reacción de PCR explota la actividad 5' nucleasa que tiene la DNA polimerasa AmpliTaq Gold para romper la sonda TaqMan durante la reacción de PCR. La sonda TaqMan contiene un marcador fluorescente en el extremo 5' denominado *reporter dye* y un *quencher dye* en el extremo 3'. Durante la reacción de PCR la sonda TaqMan hibrida específicamente sobre el fragmento a amplificar, situándose entre el cebador sentido y el cebador antisentido. Cuando la sonda está intacta, la proximidad del *reporter* con el *quencher* produce la supresión de la fluorescencia del *reporter*. La actividad 5' nucleasa de la polimerasa AmpliTaq Gold rompe la sonda separando el *reporter* del *quencher*, con lo cual se produce un incremento en la fluorescencia del *reporter*. Los fragmentos son desplazados del fragmento diana y la polimerización de la cadena continúa. Este proceso se produce en cada ciclo de la PCR y no interfiere en la acumulación exponencial del producto. La acumulación de los productos de PCR se detecta directamente por el incremento de la fluorescencia del *reporter* y ésta depende en todo momento de la cantidad de producto existente. Este incremento de la señal fluorescente sólo se detecta si la sonda es complementaria a la secuencia a amplificar y si hay amplificación durante la PCR. Estos requisitos garantizan que no se detecten amplificaciones inespecíficas. Algunas sondas TaqMan también pueden contener en el extremo 5' el denominado *minor groove binder*, molécula que incrementa la T_m de la sonda, y que por lo tanto permite el uso de sondas más cortas (Figura 9).

En esta técnica se marca un umbral de fluorescencia (*threshold*) en un punto donde la reacción de amplificación se encuentra en fase exponencial. El ciclo en el cual la reacción de amplificación atraviesa este umbral de fluorescencia se denomina C_T (*threshold Cycle*) y depende de la cantidad de ADNc presente en cada muestra.

Los resultados de la PCR son analizados con un programa específico de análisis: *Sequence Detector Software* versión 2.1 (*Applied Biosystems, CA, USA*). El resultado obtenido de las muestras para los genes problemas estandarizados, es comparado con una referencia externa (un ADNc que es utilizado en todos los ensayos realizados) utilizando un método de comparación de número de ciclos donde se produce el umbral de fluorescencia: *Comparative threshold cycle (C_T) method* (*Livak and Schmittgen, 2001*), donde la media de los valores de C_T de los genes problema son normalizados con las respectivas medias de los valores de C_T del control endógeno (β -actina), proporcionando el valor de ΔC_T . La media de los valores de ΔC_T obtenidos para la muestra externa de referencia se resta de cada valor obtenido de la media de ΔC_T para cada muestra y gen analizado. A partir de esta resta obtendremos el valor de $\Delta\Delta C_T$. El número relativo de copias de los genes problemas se calcula con la expresión $2^{-(\Delta\Delta C_T)}$ (Figura 10).

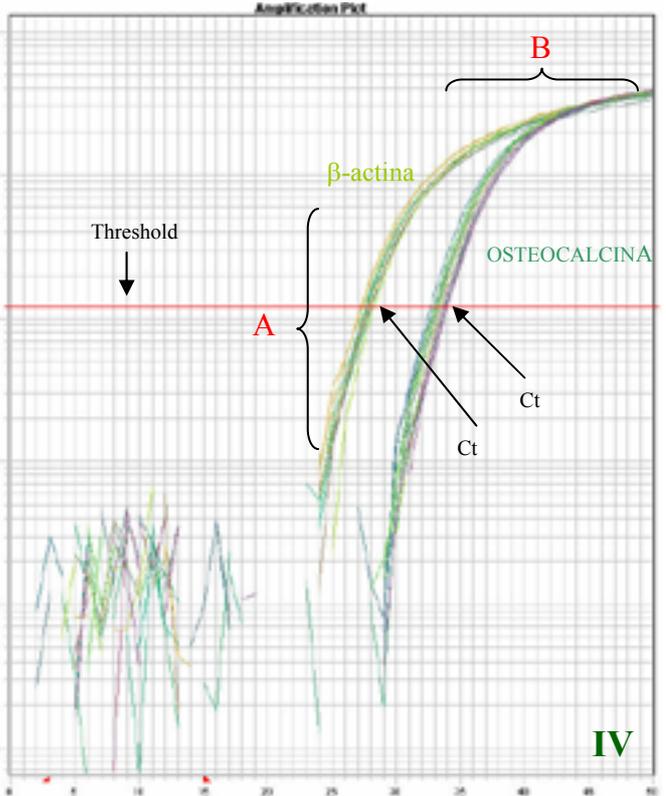
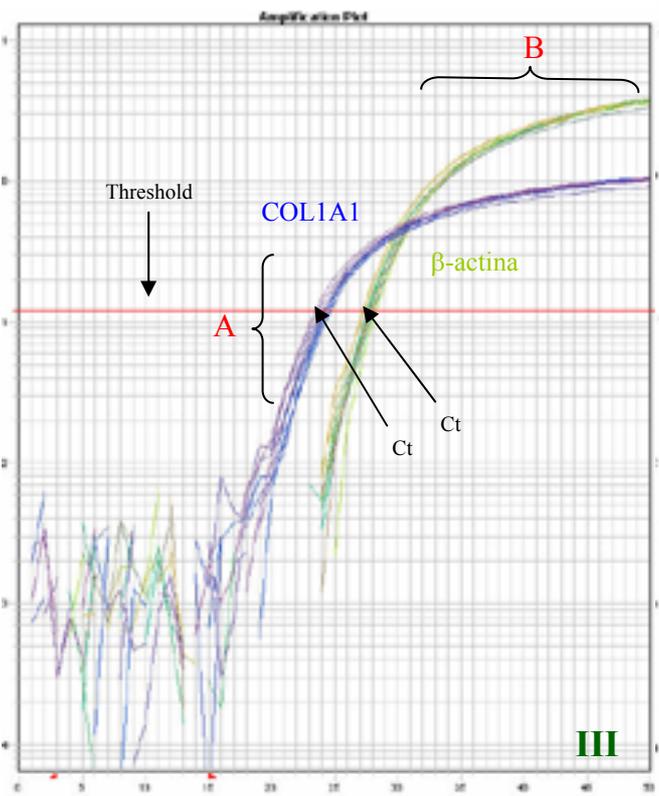
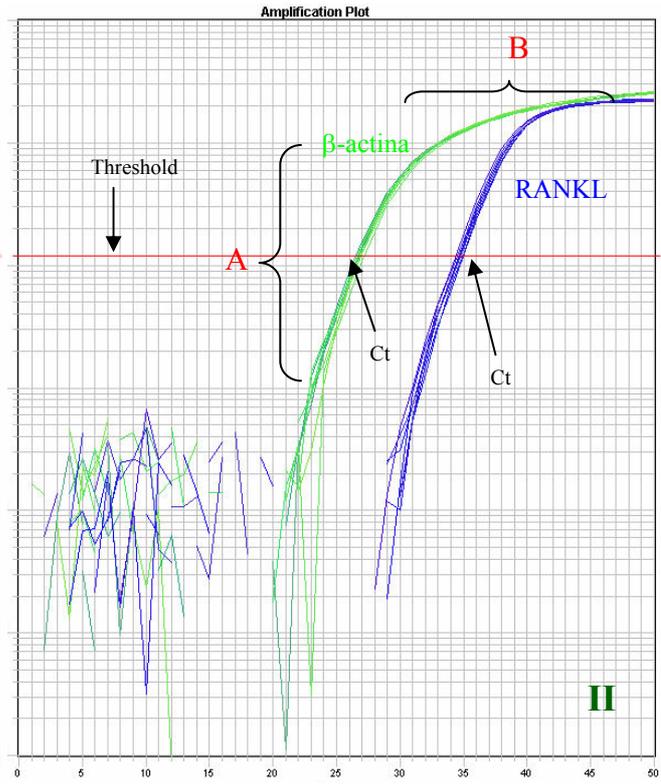
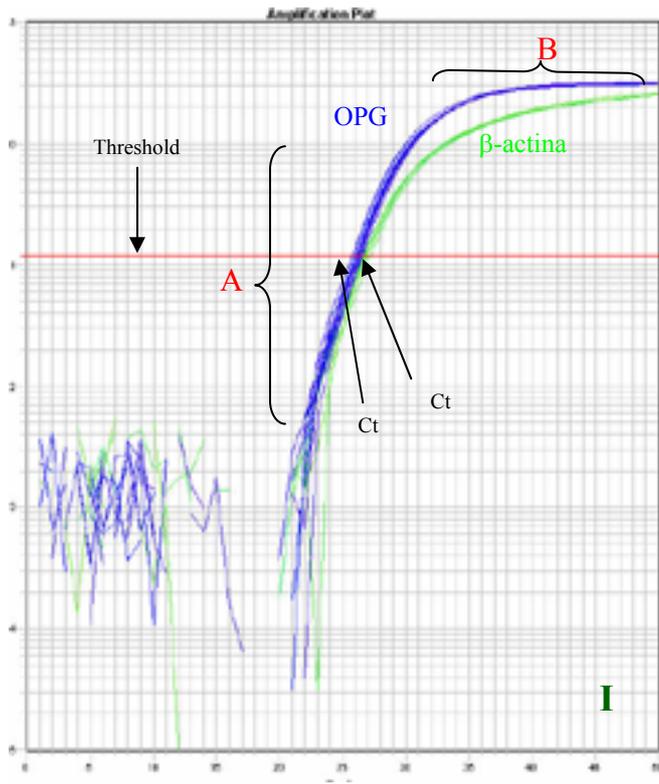
Gen	Número de identificación	Secuencia de las sondas Taqman MGB	Localización cromosómica
OPG	Hs00171068 m1	5'- CGCGCTCGTGTTTCTGGACATCTCC-3'	8q24
RANKL	Hs00243522 m1	5'- CCGACATCCCATCTGGTTCCCATAA-3'	13q14
COL1A1	Hs00164004 m1	5'- GACGAAGACATCCCACCAATCACCT-3'	17q21.3-q22.1
BGP	Hs00609452 g1	5'- CAAAGGTGCAGCCTTTGTGTCCAAG-3'	1q25-q31
Cbfa1	Hs00231692 m1	5'- TCGGGAACCCAGAAGGCACAGACAG-3'	6p21
BMP-2	Hs00214079 m1	5'- TGATATCTGGGCACTGGGATGTCTA-3'	4q21.23
β-actina	Hs99999903 m1	5'-TCGCCTTTGCCGATCCGCCGCCCGT-3'	7p15-p12

Tabla 1: Números de identificación de los productos *assay-on-demand*, las secuencias de las sondas Taqman MGB de *Applied Biosystems* (CA, USA) y su localización cromosómica, usados para la cuantificación de la expresión génica de OPG, RANKL, COL1A1, osteocalcina , Cbfa1, BMP-2 y β -actina en humanos.

La reacción de PCR se realizó en un volumen total de 20 μ l con 1 μ l de una dilución 1/10 del ADNc sintetizado, 1 μ l de la mezcla de sonda+primer (*Assay on Demand, Applied Biosystems*) específicos para cada gen determinado y con la sonda marcada con el cromóforo FAM y 10 μ l de la *TaqMan Universal PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems)*.

La reacción de PCR se realizó mediante un paso inicial a 50°C durante 2 minutos, una desnaturalización a 95°C durante 10 segundos seguido de 50 ciclos de 15 segundos a 95°C y 60 segundos a 60°C, utilizando el aparato ABI PRISM 7900 HT de *Applied Biosystems*.

Los resultados fueron analizados utilizando el SDS 2.1 software (*Applied Biosystems*) mediante una cuantificación relativa.



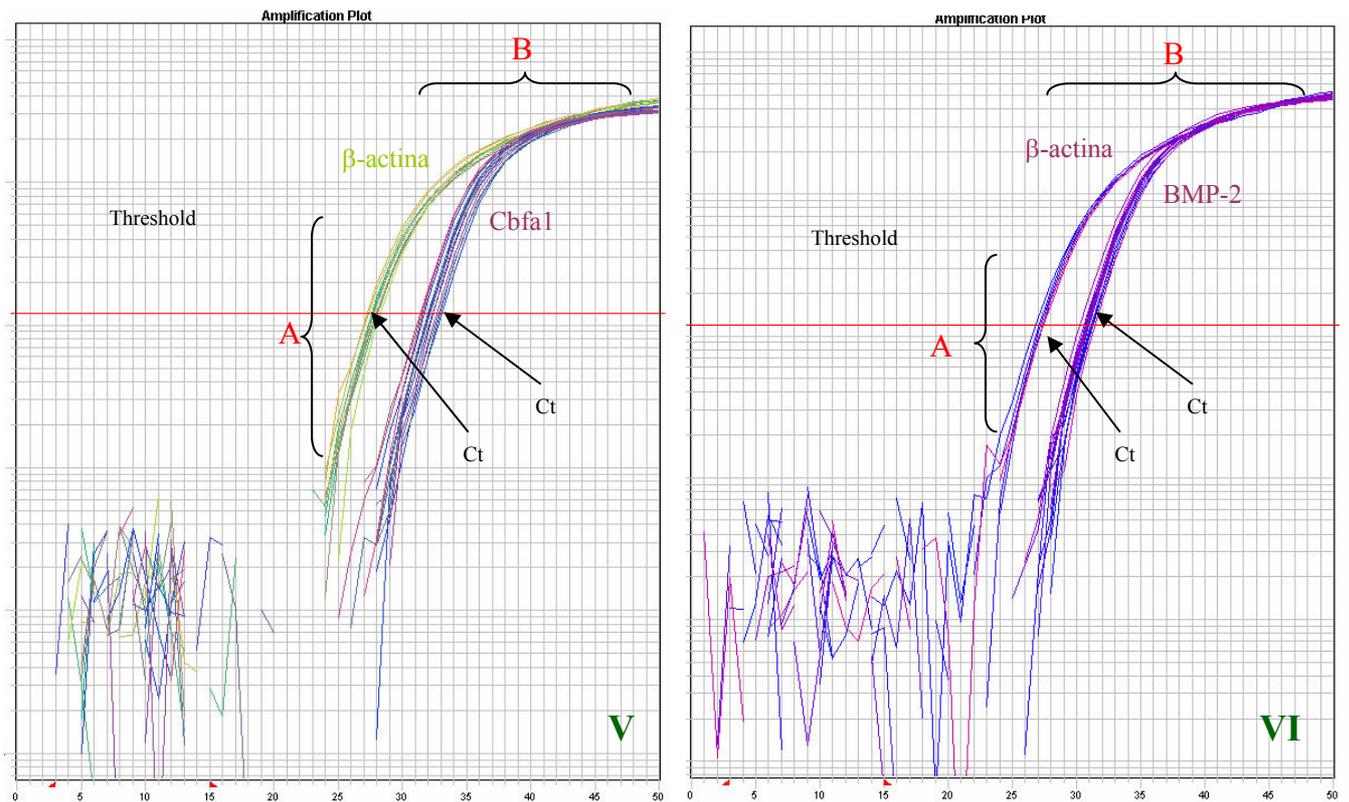


Figura 10: Esquema de la PCR a tiempo real para; **I:** *OPG*; **II:** *RANKL*; **III:** *COL1A1*; **IV:** *BGP*; **V:** *Cbfa1* y **VI:** *BMP-2*. Se utilizó en todos los casos la β -actina como control endógeno. **Ct (Cycle Threshold):** señala el ciclo en el cual la reacción de amplificación atraviesa el umbral de fluorescencia (*Threshold*) para cada uno de los genes analizados: **A:** Señala el intervalo de la reacción donde esta se encuentra en fase exponencial de los productos de amplificación. El Ct siempre se encuentra en la zona intermedia de esta fase ya que es la fase donde es correcta la correspondencia entre número de ciclos de la reacción de amplificación y cantidad de producto amplificado del gen problema y control endógeno. **B:** Señala el intervalo de la reacción donde esta se encuentra en fase “plateau” de los productos de amplificación. En esta fase la reacción se encuentra en estado de saturación donde los componentes necesarios para que se lleve a cabo la amplificación actúan como factores limitantes. En esta fase nunca se puede encontrar el Ct ya que no existe correlación directa entre número de ciclos y cantidad de producto amplificado tanto del gen problema como del control endógeno.

10 DENSIDAD MINERAL ÓSEA

La medición de la masa ósea se realizó mediante densitometría ósea utilizando la técnica de absorciometría con doble haz de rayos X (DEXA), HOLOGIC QDR 4500 SL® (Hologic, Waltham MA).

La densidad mineral ósea (DMO) es la cantidad de hueso mineralizado por unidad de área expresada en g/cm^2 y las mediciones se hicieron en columna lumbar y en cuello de fémur debido a la importancia clínica de las fracturas en estas zonas y al hecho de disponer de una mayor proporción de hueso trabecular que convierten estas regiones en las preferidas para el diagnóstico de osteoporosis.

El coeficiente de variación de las determinaciones en nuestro centro es de un 1.0% para columna lumbar y de un 1.65% para cuello de fémur.

- **Columna lumbar:** La región de interés preferida por su mayor reproducibilidad es aquella que abarca las cuatro primeras vértebras (L1-L4) en la proyección postero-anterior. Ocasionalmente pueden darse condiciones que afecten a los resultados de alguna vértebra. En esta situación deben ser excluidas de la valoración global, como ocurre ante los aplastamientos o acuñaamientos vertebrales, osteoartritis, escoliosis, artefactos de origen quirúrgico, etc.. Una exploración de columna puede estimarse como válida si se pueden utilizar al menos dos vértebras.
- **Tercio proximal del fémur:** Los programas de análisis permiten la posibilidad de ofrecer las mediciones en varias subregiones (cuello del fémur, trocánter, triángulo de Ward) o globalmente (área total). Hoy en día se aconseja prescindir de las mediciones del trocánter y triángulo de Ward ya que son las que tienen menor precisión.

La densitometría ósea (DO), además de medir la densidad mineral ósea (DMO) de un individuo en términos absolutos, permite la comparación de éste con valores de referencia poblacionales (puntuaciones o escalas T y Z)

- **Escala T (*T score*):** La comparación se establece entre la DMO individual y la DMO de los adultos jóvenes (20-35 años) y sanos del mismo sexo. Esta puntuación se expresa en forma de porcentaje y de número de desviaciones estándar en que este valor se separa de la media de la DMO de los valores de referencia. Se obtiene a partir de la DMO del paciente menos el valor medio de la DMO en los adultos jóvenes dividido por la desviación estándar de la DMO de los adultos jóvenes del mismo sexo.
- **Escala Z (*Z score*):** La comparación se establece entre la DMO individual y la DMO de individuos de la misma edad y sexo. Esta puntuación se expresa en forma de porcentaje y de número de desviaciones estándar en que este valor se separa de la media de la DMO de los valores de referencia. Se obtiene a partir de la DMO del paciente menos el valor medio de la

MO de individuos de la misma edad y sexo dividido por la desviación estándar de la población sana de la misma edad y sexo.

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El cálculo estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS 11.5.

Los resultados de las distintas variables se introdujeron en una matriz de datos para el análisis estadístico.

En los experimentos de proliferación celular y en la PCR a tiempo real, la comparación entre grupos de tratamiento se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) con el modelo lineal para un factor. Posteriormente para la comparación entre dos grupos (caso-control / diferentes concentraciones de estatinas – no adición de estatinas) se utilizó el test t de Student (previa comprobación de homogeneidad de varianzas).

Los resultados se expresaron como media +/- desviación estándar de la media (DS).

Se consideraron significativas las $p < 0.05$ y en cada uno de los experimentos se especifica el tipo de análisis estadístico utilizado.

V. Subestudio I

ANÁLISIS DEL CULTIVO PRIMARIO DE OSTEOLASTOS HUMANOS Y LA LÍNEA TUMORAL MG-63 COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DE PATOLOGÍAS METABÓLICAS ÓSEAS Y EL EFECTO DE FACTORES REGULADORES Y FÁRMACOS EN EL HUESO.

HIPÓTESIS DE TRABAJO: El cultivo *in vitro* de osteoblastos humanos es un buen modelo para el estudio de las enfermedades metabólicas óseas porque la memoria celular que se mantiene en los primeros pases del cultivo celular nos permite la extrapolación *in vivo* de los resultados para el análisis del tejido óseo del individuo. El cultivo de osteoblastos humanos nos permite tanto el estudio de patologías metabólicas óseas, como de la fisiología celular ósea, los factores sistémicos y locales que intervienen en el remodelado óseo y la respuesta a fármacos o sustancias sintéticas o naturales.

OBJETIVO:

- 1- Estudio observacional del cultivo primario de osteoblastos y de la línea celular MG-63.

1. CULTIVO DE OSTEÓBLASTOS HUMANOS

En este primer subestudio del trabajo se pretendió realizar un análisis observacional del cultivo de osteoblastos humanos como modelo de trabajo para valorar la fiabilidad y reproductividad de los resultados obtenidos en los siguientes subestudios.

1.1 CULTIVO PRIMARIO DE OSTEÓBLASTOS HUMANOS

Durante todo el proceso de cultivo, las células fueron controladas observándolas al microscopio óptico y descartando la posible contaminación por levaduras, hongos o bacterias.

Con los objetivos de 10 y 20 aumentos se observó completamente todo el área de cultivo para controlar el correcto crecimiento de las células y su desarrollo.

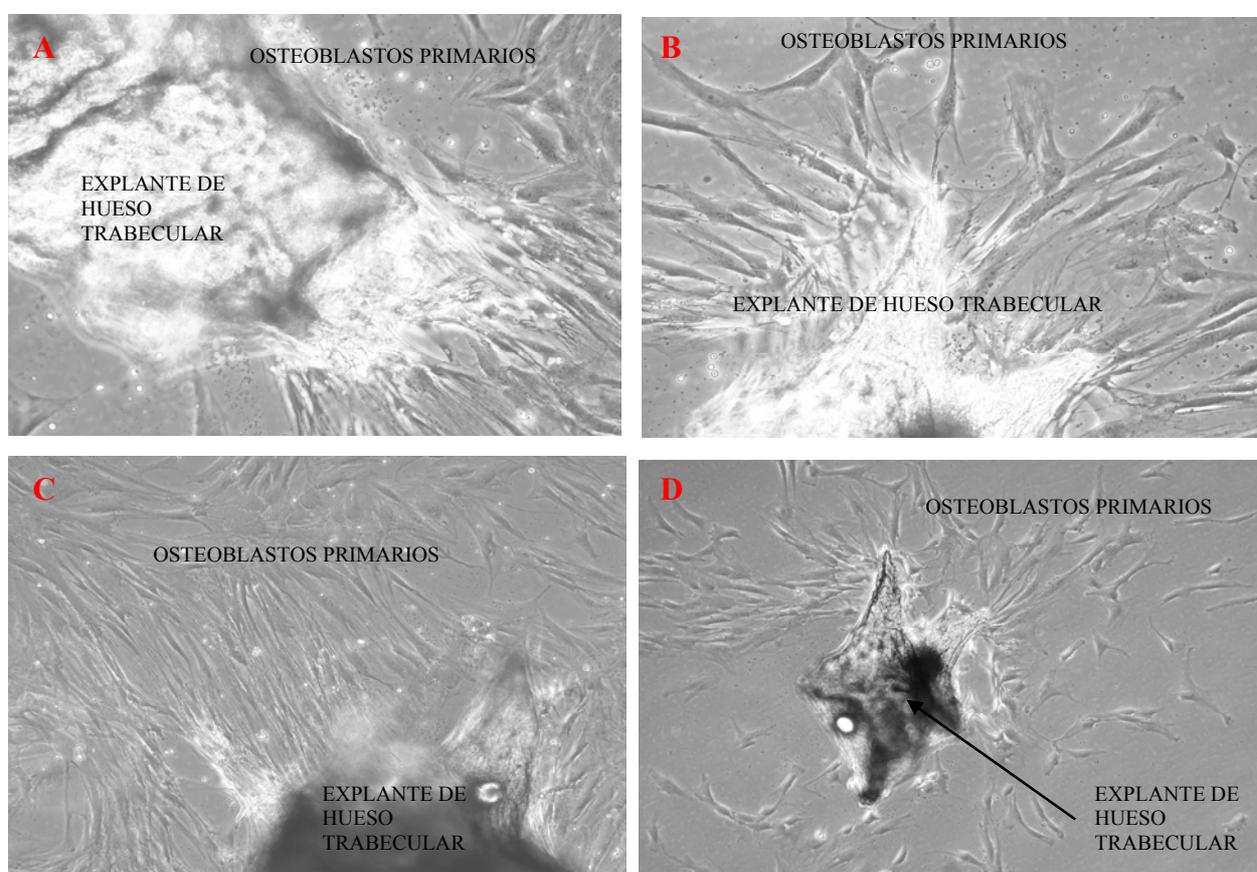


Figura 1: Imagen de las células osteoblásticas migrando de los explantes óseos. **A y B:** 200x **C y D:** 100x.

En el análisis de la morfología osteoblástica se realizó un seguimiento exhaustivo de los cultivos a lo largo del tiempo desde la deposición de los explantes óseos encima de las placas de cultivo, tratadas para que tengan capacidad adherente, hasta alcanzar la confluencia. En la figura 1 se muestra la imagen de los osteoblastos migrando de los explantes de tejido trabecular.

El hueso trabecular utilizado para la realización de este trabajo, ya sea el obtenido a partir de muestras de rodilla utilizado para la realización del subestudio II, el “pool” de células osteoblásticas formado a partir

de la mezcla de las muestras de restos de cabeza de fémur de tres pacientes sanas utilizada para el subestudio III y las muestras de biopsia de cresta ilíaca utilizadas en el subestudio IV, en todos los casos tenía las mismas características. El tratamiento previo que se les realizó a los explantes de hueso trabecular antes de depositarlos en las placas de cultivo fue un lavado con una solución salina de forma que se eliminaran todas las células hematopoyéticas y todas las células no adherentes que se encontraban presentes “*in vivo*” en el tejido óseo. Las únicas células que quedaron en estos fragmentos óseos fueron los osteocitos dentro de las trabéculas, correspondientes a antiguos osteoblastos que habían llegado a su fase terminal, posibles osteoblastos y osteoclastos activos unidos a las superficies óseas remanentes (que se encontraban unidos a las superficies óseas en el momento del procesado de la muestra y que estaban realizando su actividad de formación y resorción en las zonas donde se estaba llevando a cabo remodelado óseo), células estromales y/o por último las células mesenquimales y precursores de osteoblastos (prosteoblastos) en las diferentes etapas de diferenciación hacia osteoblastos maduros con capacidad formadora de hueso, presentes en la superficie interna del hueso (endostio).

Es por este motivo que, cuando hablamos de cultivo primario de células osteoblásticas, nunca podemos hablar de un cultivo puro donde todas las células que lo componen formen parte de una misma estirpe celular. En este caso se trataría de un cultivo de osteoblastos con una fracción pequeña de algunos de los otros tipos celulares citados anteriormente. Además existe la posibilidad que se produzca contaminación por fibroblastos provenientes de tejidos colindantes al hueso debido a que han quedado pequeños fragmentos adheridos al hueso. Es importante minimizar al máximo esta contaminación por proximidad de fibroblastos procedentes de tejidos colindantes porque el fibroblasto es una célula más proliferativa que el osteoblasto y podría llegar a formar un porcentaje elevado de las células presentes en el cultivo.

Durante las distintas etapas del cultivo celular, los osteocitos, al no tener capacidad proliferativa, consecuencia de su diferenciación terminal, no migran de su posición inicial dentro de las trabéculas que forman el hueso trabecular. Asimismo no ocupan la superficie de la placa y por lo tanto no formarán parte del cultivo primario. Probablemente el destino de los osteocitos existentes en el interior de las trabéculas será la apoptosis o la muerte por falta de permeabilidad de los nutrientes y estímulos externos de los factores locales y paracrinos en el interior de la trabécula.

Las células que quedan remanentes en las unidades de remodelado óseo en determinadas zonas de la superficie ósea, no proliferan, pierden su actividad y no tienen repercusión en el cultivo celular. De esta forma los posibles osteoclastos que se pueden observar de forma aislada en las placas de cultivo no proceden de la migración de los osteoclastos maduros, sino que proceden de la diferenciación a partir de células mesenquimales hematopoyéticas que no han sido eliminadas en el lavado inicial del proceso de cultivo celular. De esta forma se puede afirmar en gran medida que prácticamente la totalidad de las células que forman el cultivo primario provienen de las células mesenquimales precursoras de osteoblastos (preosteoblastos). Las células precursoras presentes en el periostio pueden estar ya imprimadas para formar osteoblastos o pueden estar en estadios más precoces de la diferenciación celular. Las primeras serían las que migrarán y formarán la monocapa de células en la superficie de la placa y las

segundas no se encuentran marcadas para formación específica de osteoblastos, y por lo tanto, potencialmente podrían formar cualquier tipo celular derivadas de las células mesenquimales. Estas segundas células mesenquimales precursoras de osteoblastos se diferenciarían en osteoblastos bajo el estímulo de factores locales como el factor de crecimiento fibroblástico (*fibroblast growth factor*: FGF), proteínas formadoras de hueso (*Bone Morphogenic Proteins*: BMPs) y las proteínas Wnt, y también requerirían los factores de transcripción Runx2/Cbfa1 y Osterix. Estos precursores empiezan a proliferar y diferenciarse en preosteoblastos y posteriormente se convertirían en osteoblastos maduros. Bajo la influencia de otros factores estas células progenitoras pueden formar otros tipos celulares pero, de todos modos, la mayoría de los otros tipos celulares que potencialmente pueden dar lugar estas células mesenquimales (como los adipocitos y las células musculares) tienen requerimientos específicos que no obtienen en nuestro cultivo celular, por lo que los únicos tipos celulares a los que podrían derivar de forma más probable sería a osteoblastos o fibroblastos. Los nutrientes y factores de crecimiento requeridos por los osteoblastos y fibroblastos son muy parecidos y no se conoce hasta el momento un sistema de cultivo restrictivo que favorezca la proliferación osteoblástica por encima de la de los fibroblastos. Algunos autores suplementan el medio de cultivo celular con ácido ascórbico que actúa como agente anabólico que favorece la diferenciación celular, ya que en última instancia el osteoblasto no es más que un fibroblasto sofisticado altamente diferenciado.

Algunos autores dentro del protocolo del cultivo de osteoblastos incluyen la digestión enzimática con colagenasa y/o con pronasa, con la finalidad de minimizar la contaminación por presencia de otros tipos celulares ya que la colagenasa actúa disgregando el tejido conectivo presente. La digestión enzimática promueve la eliminación de las células adheridas a las superficies óseas. En nuestro grupo realizamos una comparación de los cultivos primarios (procedentes de la misma muestra) realizando un protocolo con y sin digestión enzimática. La técnica de digestión enzimática produce una selección de las células más resistentes a los enzimas adicionados y esto podría sesgar la homogeneidad de las muestras. Los parámetros para analizar las diferencias entre los dos protocolos de cultivo fueron la valoración cualitativa del porcentaje de osteoblastos en el cultivo realizando la histoquímica de la fosfatasa alcalina. Obtuvimos los mismos resultados en los dos tipos de cultivo siendo en ambos casos positivos, y no se observaron diferencias entre ellos. A la vista de estas observaciones se tomó la decisión de continuar utilizando el sistema tradicional ya que si el resultado resultaba ser prácticamente el mismo, el hecho de evitar la digestión enzimática se consideró que favorecía la integridad de las células. En la observación diaria de los cultivos, aquellos que no habían estado tratados con enzimas digestivos empezaban la migración celular de forma más temprana y por este motivo también se pensó que las células guardarían mejor la memoria de su origen si no se las sometía a un sistema agresivo como son las enzimas digestivas.

El problema que produce la contaminación por fibroblastos es que morfológicamente es muy difícil distinguir los dos tipos celulares, de forma que fue necesaria la caracterización celular para corroborar la pureza del cultivo.

Otro argumento que nos permite trabajar con la seguridad de tener hegemonía osteoblástica en los cultivos primarios sería que durante el proceso de cultivo, donde van migrando los precursores osteoblásticos, se produzca una retroalimentación positiva de forma que estos osteoblastos emergentes van favoreciendo la proliferación de nuevos osteoblastos. Este proceso de retroalimentación positiva se realizaría mediante la expresión génica, por parte de los osteoblastos maduros, de factores de transcripción específicos, como el Cbfa1 y el Osterix que son específicos de osteoblastos y que pueden interactuar en las regiones promotoras de genes específicos que promocionan la diferenciación osteoblástica.

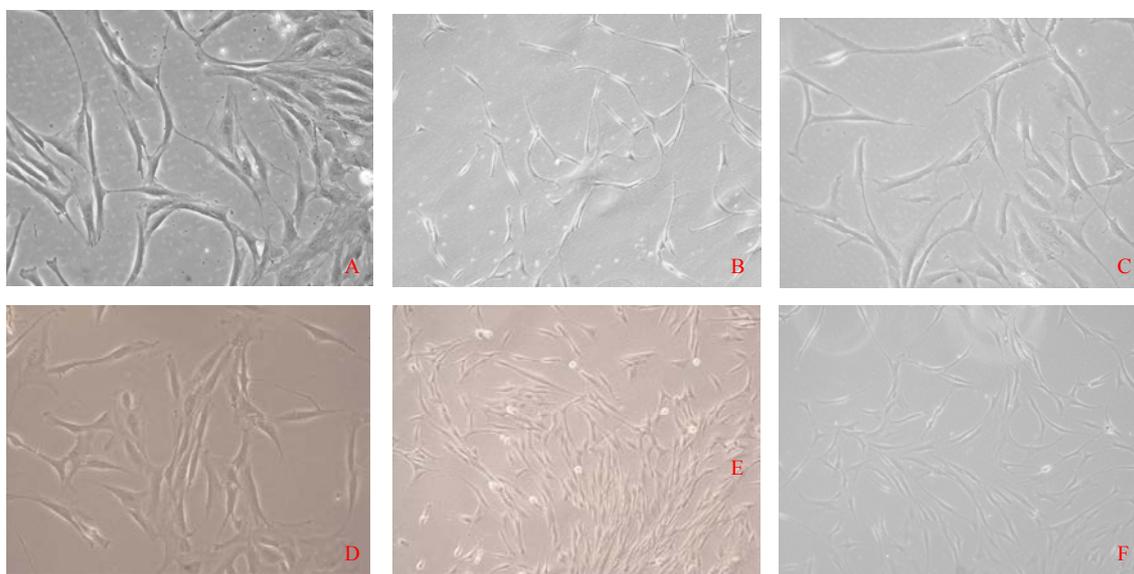


Figura 2: Cultivo primario de osteoblastos en las dos primeras semanas de cultivo (100x y 200x). **A, B, C, D:** Imágenes del fenotipo de las células osteoblásticas en estadios avanzados de diferenciación donde el citoplasma aparece con un aspecto granuloso y expandido superficialmente formando uniones con las membranas citoplasmáticas de las células contiguas. E, F: Imágenes del fenotipo de las células osteoblásticas en estadios menos avanzados de diferenciación celular. Las membranas citoplasmáticas aparecen refringentes ya que corresponden a células que no se encuentran muy extendidas y aun mantienen una morfología en relieve.

Este conjunto de imágenes ilustra la gran variedad interindividual que existe en el cultivo primario de osteoblastos. Todos ellos corresponden al mismo momento del cultivo primario y en cambio la morfología celular adquirida en cada uno de ellos varía cualitativamente de forma evidente en cuanto a densidad celular y etapas de diferenciación de los osteoblastos que lo forman. Se observa que mientras unos cultivos se encuentran en estadios proliferativos otros ya han empezado a adquirir la morfología fusiforme para crear la monocapa de células, orientándose en la misma dirección. Por último también se muestran cultivos donde las células han adoptado un fenotipo de células senescentes con citoplasmas muy granulados y formas estrelladas parecidas a la morfología osteocítica.

Los precursores osteoblásticos que van migrando de las superficies óseas de los explantes van ocupando la placa de cultivo y dividiéndose. El citoplasma del osteoblasto desarrolla digitaciones características de los primeros estadios del cultivo celular (figura 2.A,B,C,D). Las líneas celulares donde se observaba un fenotipo celular más estrellado, con células de mayor tamaño y con un citoplasma muy granuloso, se correlacionaban con líneas que presentaban una proporción de células con fenotipo osteoblástico mayoritariamente determinado por los métodos utilizados para la caracterización celular (fosfatasa alcalina y expresión génica de osteocalcina). Por lo tanto, cuando las células presentaban este tipo de fenotipo se podía considerar que eran cultivos con las células muy diferenciadas y solían relacionarse con cultivos que no acaban de llegar nunca a la confluencia. Las líneas celulares donde las células presentaban un fenotipo caracterizado por un citoplasma claro poco extendido y el tamaño de las células era pequeño (Figura 2.E,F) solían corresponderse a líneas que mantenían su capacidad proliferativa y que llegarían rápidamente a la confluencia.

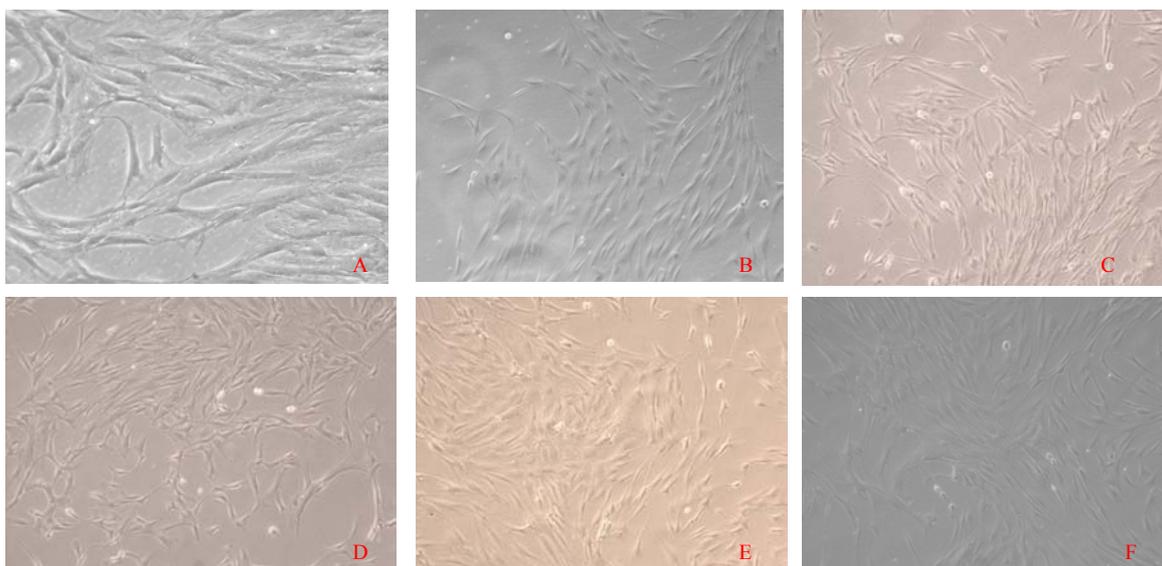


Figura 3: Cultivo primario de osteoblastos en la tercera semana de cultivo (100x y 200x). En estas imágenes se ilustra el fenotipo osteoblástico cuando las células se encuentran en estadios de subconfluencia. En estas circunstancias también existe gran variedad morfológica y de ritmo de crecimiento.

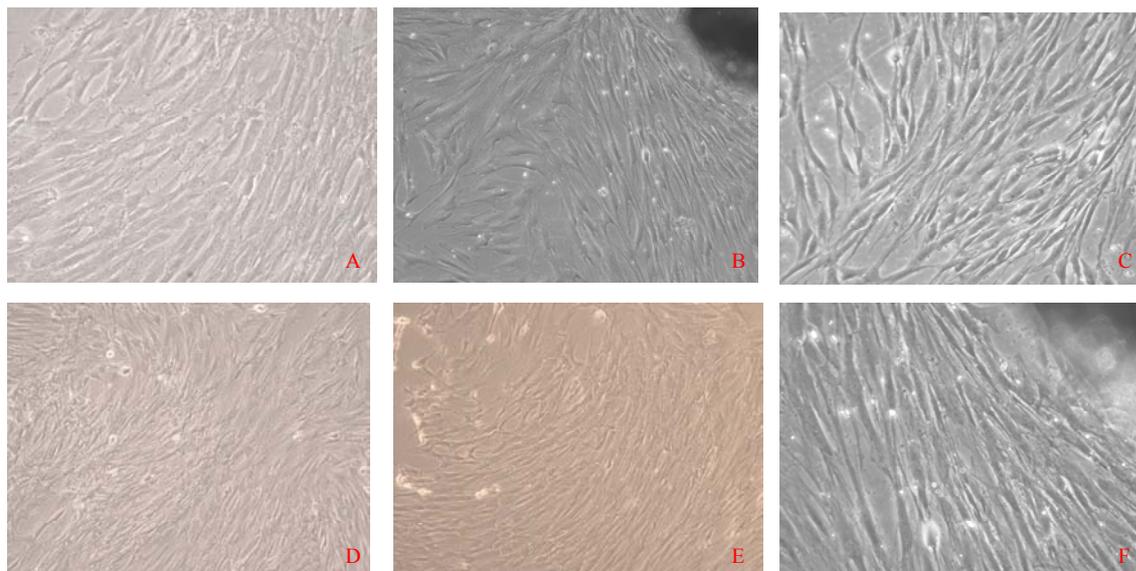


Figura 4: Cultivo primario de osteoblastos en la cuarta semana de cultivo (100x). Este conjunto de imágenes corresponde a cultivos celulares que han llegado a la etapa de confluencia.

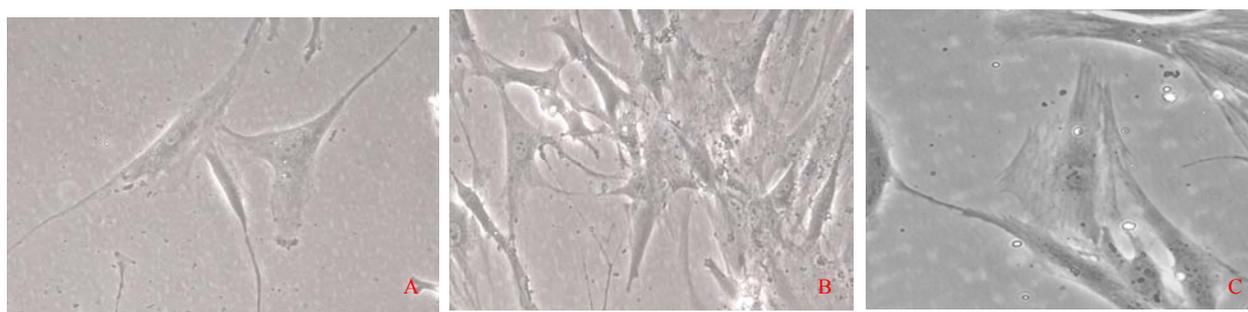


Figura 5: Detalles células osteoblásticas (400x). En estas imágenes aparecen las variadas morfologías que pueden adquirir los osteoblastos en cultivo primario. Se puede observar en alguna de las imágenes el núcleo de las células con sus correspondientes nucleolos.

A medida que transcurrían las sucesivas divisiones, las células se mantenían unidas por sus expansiones citoplasmáticas pero estas se iban comprimiendo adoptando una morfología cada vez más fusiforme. De forma general las células, a medida que se va formando la monocapa, se orientan en la misma dirección (figura 3 y 4).

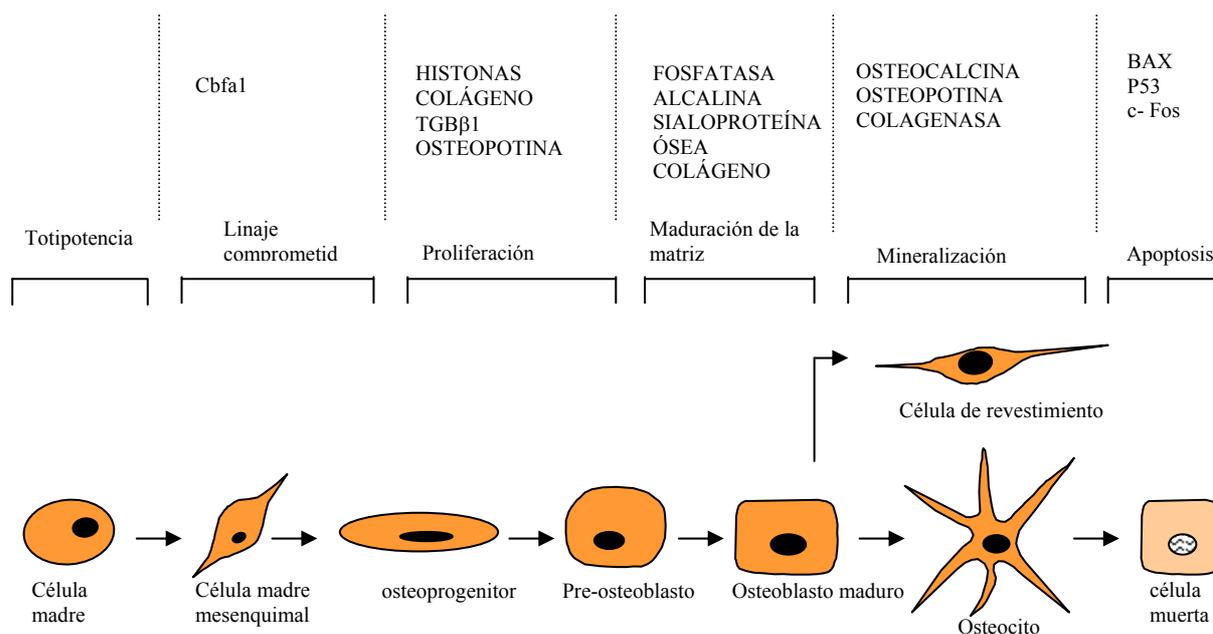


Figura 6: Crecimiento y diferenciación de los osteoblastos. Esquema de los diferentes estadios de diferenciación osteoblástica y los marcadores celulares más importantes de cada estadio de maduración celular.

En el tejido óseo, los preosteoblastos comprometidos en estadios no proliferativos se reconocen cerca del hueso por su proximidad a los osteoblastos superficiales y por su detección histoquímica de la fosfatasa alcalina que es uno de los marcadores de fenotipo osteoblástico más precoz. Los osteoblastos activos se distinguen encima de las superficies óseas por sus propiedades morfológicas y ultraestructurales, que son las típicas de una célula que está sintetizando activamente matriz celular conectiva, tienen un núcleo largo, aparato de Golgi muy desarrollado y retículo endoplasmático muy extendido [Lian y col., 2003]

Cuando observamos el cultivo celular de osteoblastos un factor limitante que teníamos era que, al tratarse de un cultivo en dos dimensiones, las células perdían su capacidad de distribuirse heterogéneamente, juntándose por grupos de células en diferente estadio de diferenciación. Existe gran dificultad para distinguir morfológicamente los grados de diferenciación celular de células cultivadas pero, tal y como se observa en las fotos de los detalles de células osteoblásticas, se pueden distinguir en cada línea celular los niveles de diferenciación celular mayoritarios que aparecen. Las líneas celulares más diferenciadas se correlacionaban positivamente con aquellas líneas con mayor actividad fosfatasa alcalina. Según la bibliografía (figura 6), la fosfatasa alcalina parece ser un marcador osteoblástico de las primeras etapas de diferenciación. A primera vista esto se contradicaría con nuestros resultados ya que en nuestro caso más diferenciación indicaba más actividad fosfatasa alcalina. Este fenómeno se explica de la siguiente forma: en las líneas menos diferenciadas se obtenía elevadísima actividad fosfatasa alcalina, ya que se tiñen todas

las células, pero la tinción celular era leve. En cambio en las líneas celulares más diferenciadas aparecía una tinción muy fuerte en las membranas celulares, hecho indicativo de que eran células con elevada secreción proteica.

Cuando comparamos a nivel morfológico las líneas de osteoblastos primarios con la línea transformada de osteosarcoma humano (MG-63) se observaron importantes diferencias. Las MG-63 son células con una elevada capacidad proliferativa, observándose células de tamaño pequeño sin la presencia de las interdigitaciones citoplasmáticas típicas de los osteoblastos. Mayoritariamente tenían un citoplasma con un aspecto claro, hecho que nos corroboró que eran células con una capacidad secretora limitada ya que los orgánulos citoplasmáticos como el retículo endoplasmático o el aparato de Golgi no se presentaban de forma importante como en el caso de las células típicamente secretoras. Parece ser que debido a su origen tumoral, tienen desviada gran parte de la maquinaria celular hacia la proliferación. A pesar de ser un buen modelo osteoblástico, las células no presentaban inhibición por contacto y al llegar a la confluencia seguían creciendo de forma incontrolada cambiando su morfología hacia células redondas.

Por último, está descrito que en el trabajo con líneas celulares modificadas éstas están sometidas a inestabilidad para su contenido de cromosomas, que puede alterar el genotipo y fenotipo de estas a lo largo de los subcultivos dándonos resultados inciertos.

Las ventajas de trabajar con el cultivo de células osteoblásticas son varias. En primer lugar permite el control de las condiciones físicas de crecimiento como la temperatura, la concentración de CO₂ que nos proporciona la estufa de cultivo celular y además permite el control de las condiciones químicas de crecimiento a nivel de pH y nutrientes del medio. Los medios utilizados contenían un indicador de pH (rojo de fenol) que viraba cuando se producía una modificación del pH, y contenían una concentración de nutrientes controlada y óptima para el crecimiento (aminoácidos, minerales, etc.). El suero de ternera fetal adicionado en el medio de cultivo, que nos proporcionaba los factores de crecimiento necesarios para el crecimiento celular, estaba sometido a más variabilidad ya que dependía de la procedencia del suero y del lote utilizado, con lo que se convertía en una variable de control menos precisa.

Otra de las ventajas que nos ofrece el cultivo celular es la homogeneidad celular anteriormente citada; el tejido óseo está formado por una variedad de tipos celulares y el cultivo nos minimiza esta variedad permitiéndonos trabajar con una muestra con elevada homogeneidad. Esto permite la reproducibilidad de los experimentos realizados hecho que añade potencia y validez a los resultados obtenidos en los experimentos realizados. Se trata de una técnica relativamente económica ya que precisa de una infraestructura sencilla y permite testar agentes en concentraciones más bajas que si se tratara de un organismo vivo.

De todos modos la técnica de cultivo celular tiene importantes desventajas como son la necesidad de mantener condiciones asépticas para evitar contaminaciones por bacterias, levaduras o hongos que tienen una velocidad de crecimiento mucho más rápida que los osteoblastos. Por este motivo nos obligó a

trabajar con la presencia de antibióticos de amplio espectro en el medio y esto puede distorsionar el comportamiento natural de estas células. Otro factor limitante del cultivo celular es la necesidad de trabajar con un número elevado de células, hecho que obliga a disponer de gran cantidad de tejido y no siempre es posible.

En nuestros experimentos se trabajó con el primer subcultivo a partir del cultivo primario. Con este subcultivo se minimiza el crecimiento de otros tipos celulares presentes en el cultivo primario. De esta forma podemos trabajar con una muestra celular mucho más homogénea. Al realizar el subcultivo las células tienen un periodo de latencia antes de empezar de nuevo su ciclo celular y durante esta fase las células reemplazan el glicocálix eliminado durante el subcultivo, se unen en el sustrato y reparten el citoesqueleto. Este proceso de adaptación puede tener más o menos duración en función del grado de confluencia del cultivo anterior del que provienen.

La síntesis proteica que realizan las células de forma mayoritaria es variable a largo de los sucesivos ciclos de proliferación y en función de la densidad celular. Llegada la confluencia, las células producen inhibición del crecimiento por contacto con lo que al dejar de dividirse desvían la maquinaria celular hacia la secreción de proteínas especializadas en detrimento de proteínas estructurales. Es por este motivo por el que es fundamental realizar siempre todos los experimentos a una misma densidad celular, preferentemente cuando las placas no han llegado a la confluencia (subconfluencia) ya que en estas condiciones la célula se expresa libremente sin la limitación producida por la densidad. Trabajar con cultivos que se encuentran en distintos niveles de densidad celular nos impediría atribuir que las diferencias observadas pudieran ser debidas a un distinto comportamiento osteoblástico intrínseco línea-dependiente, pudiéndose adjudicar a un comportamiento diferencial producido por el efecto de la densidad celular. En los trabajos realizados con la línea celular MG-63 (derivada de un tumor sarcomatoso humano) no tenemos este problema de la densidad ya que el umbral de inhibición de la proliferación en esta línea es mucho más elevado para no decir inexistente. Por este motivo nos permite una mayor permisividad en el control de la densidad celular al realizar los experimentos.

A la vista de todas estas observaciones y de considerar el cultivo osteoblástico un buen modelo para el estudio de patologías metabólicas óseas y efectos de un tratamiento, la validez de los hallazgos conseguidos en dicho modelo de cultivo *in vitro* requiere siempre el posterior testado *in vivo* para corroborar el comportamiento celular dentro del tejido óseo.

VI. Subestudio II

CULTIVO PRIMARIO DE OSTEOLASTOS DE PACIENTES CON OSTEOPOROSIS POSMENOPÁUSICA. ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DEL SISTEMA DE REGULACIÓN OPG/RANKL, EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN Cbfa1 Y EL FACTOR DE CRECIMIENTO BMP-2 IMPLICADOS EN LA OSTEOLASTOGÉNESIS, Y EL COLÁGENO TIPO 1 Y LA OSTEOCALCINA IMPLICADOS EN LA SÍNTESIS DE LA MATRIZ ÓSEA.

HIPÓTESIS DE TRABAJO: El desequilibrio en el remodelado causante de la osteoporosis posmenopáusica es consecuencia de una disfunción en la proliferación osteoblástica que disminuye la formación ósea y/o una anomalía en los mecanismos de regulación de la resorción ósea, la osteoblastogénesis y la deposición de la matriz ósea que provocan un balance a favor de la osteoclastogénesis y la resorción ósea.

OBJETIVOS:

1. Analizar *in vitro* las diferencias en la proliferación entre osteoblastos primarios de mujeres menopáusicas osteoporóticas y no osteoporóticas.
2. Determinar *in vitro* las diferencias en los niveles de expresión génica del sistema de regulación del remodelado OPG/RANKL entre las líneas de osteoblastos primarios de mujeres menopáusicas osteoporóticas y no osteoporóticas.
3. Determinar *in vitro* las diferencias en los niveles de expresión génica del polipéptido $\alpha 1$ del colágeno tipo 1 (COL1A1), la osteocalcina, la proteína morfogénica ósea o *bone morphogenetic protein-2* (BMP-2) y el factor de transcripción Cbfa1 entre las líneas de osteoblastos primarios de mujeres menopáusicas osteoporóticas y no osteoporóticas.
4. Determinar *in vitro* las diferencias en el efecto del suero de ternera fetal (FCS), la vitamina D y del 17β -estradiol sobre la expresión génica del sistema de regulación OPG/RANKL entre las líneas de osteoblastos primarios de mujeres menopáusicas osteoporóticas y no osteoporóticas.

1. RESULTADOS

1.1 PACIENTES SELECCIONADAS

Para la realización de este apartado del trabajo se obtuvieron un total de 21 muestras de rodilla procedentes de pacientes sometidos a reemplazo por prótesis de rodilla. Cada una de las muestras obtenidas se separaron formando dos grupos en función de la patología osteoporótica, siguiendo los criterios densitométricos de la OMS (Organización Mundial de la Salud) que tienen en cuenta los valores de Tscore (ver tabla 2, introducción). De esta forma se analizaron un grupo de pacientes osteoporóticas formado por un total de 9 pacientes, y un grupo de pacientes que se utilizó como control, formado por 12 pacientes sanas (no osteoporóticas) incluidas en el estudio siguiendo estrictamente los criterios de inclusión y exclusión propios del diseño del estudio (ver apartados 1.1.1 y 1.1.2). Todas las pacientes incluidas en el estudio dieron su consentimiento informado de aceptación de la participación y todas ellas fueron informadas de los objetivos del estudio y de la confidencialidad de los datos personales.

No existían diferencias significativas en la edad de las pacientes entre los dos grupos ($p=0.367$).

En la tabla 1 aparecen las características de los dos grupos de pacientes analizados, teniendo en cuenta la edad en el momento de la intervención quirúrgica, la densidad mineral ósea (DMO) de columna y de fémur, y los valores de Tscore y Zscore obtenidos al comparar los valores de DMO de las pacientes con los valores poblacionales.

GRUPO	N	EDAD	DMOcolumna (g/cm²)	DMOfémur	Tscore	Zscore
osteoporosis	9	74±6.3	0.917±0.130*	0.591±0.073*	-2.79±0.9	-0.074±0.912
no osteoporosis	12	69.6±5.7	1.066±0.240*	0.782±0.068*	-1.17±0.9	1.050±0.764

Tabla1: Características de las pacientes seleccionadas para el estudio clasificadas en dos grupos: pacientes osteoporóticas y no osteoporóticas. **N:** nº de pacientes incluidas. **EDAD:** Edad de las pacientes en el momento de la intervención quirúrgica expresada como media ± desviación estándar. **DMOcolumna:** Valores de densidad mineral ósea en columna expresados como media ± desviación estándar. **DMOfémur:** Valores de densidad mineral ósea en fémur expresados como media ± desviación estándar. **Tscore:** Valor obtenido de la comparación entre la densidad mineral ósea (DMO) individual y la DMO de los adultos jóvenes (20-35 años) y sanos del mismo sexo expresado como media ± desviación estándar. **Zscore:** Valor obtenido de la comparación se establece entre la DMO individual y la DMO de individuos de la misma edad y sexo expresado como media ± desviación estándar.

* $p<0.05$ prueba T para la igualdad de medias (test de t de Student)

Existen diferencias estadísticamente significativas en la BMD de columna ($p=0.004$) y fémur ($p=0.000$) entre grupos siendo inferior en el grupo de mujeres menopáusicas con osteoporosis en los dos casos.

1.2 PROLIFERACIÓN CELULAR EN OSTEÓBLASTOS PRIMARIOS DE PACIENTES MENOPÁUSICAS OSTEOPORÓTICAS Y NO OSTEOPORÓTICAS

El primer objetivo planteado en el presente estudio fue la determinación de la posible existencia de diferencias en la cuantificación de la proliferación osteoblástica entre los cultivos primarios del grupo de pacientes con osteoporosis posmenopáusica y el grupo control de mujeres no osteoporóticas. La medida de la proliferación celular refleja la capacidad de una población celular de aumentar el número de células durante un periodo de tiempo.

Se estudió la proliferación celular realizando el recuento del número de células total a través del tiempo durante un intervalo de 14 días que es el tiempo necesario para que un cultivo de osteoblastos llegue a la confluencia en las condiciones experimentales de densidad celular inicial estipulados en el estudio experimental.

Para comprobar que todas las líneas celulares seguían el modelo de crecimiento característico de las células osteoblásticas se realizaron las rectas de regresión lineal a partir del logaritmo de los valores obtenidos en las curvas de crecimiento celular. En ambos grupos se obtuvo una regresión lineal con valores superiores a 0.85 (grupo osteoporóticas: 0.903 ± 0.03 (media \pm desviación estándar), grupo control: 0.873 ± 0.0984 (media \pm desviación estándar)), con lo que de forma significativa se pudo considerar que existía regresión lineal. Este análisis permitió afirmar que las curvas seguían el modelo de crecimiento con fase de latencia, exponencial y estacionaria. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de la r de regresión de los dos grupos de estudio. La pendiente de la recta de regresión es un indicativo de la velocidad de división celular de cada una de las líneas celulares y los valores fueron de 0.262 ± 0.04 (media \pm desviación estándar) en el grupo osteoporótico y 0.239 ± 0.06 (media \pm desviación estándar) en el grupo control no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos. Los valores de ordenada al origen de la recta de regresión fueron de 14.069 ± 0.46 (media \pm desviación estándar) en el grupo de pacientes osteoporóticas y 14.202 ± 0.45 (media \pm desviación estándar) en el grupo control, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

En la tabla 2 se presentan los resultados de la cuantificación de la proliferación celular mediante el recuento del número de células/pocillo a diferentes tiempos de crecimiento en los dos grupos de estudio (osteoporóticas/ no osteoporóticas).

En las figuras 1,2 y 4 se representan las curvas de proliferación celular de cada una de las líneas analizadas realizando un triple recuento de cada tiempo. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las líneas celulares agrupadas por patología osteoporótica. Al analizar los recuentos

celulares se observó una gran variabilidad entre línea pero esta variabilidad no se correlacionaba con el grupo de procedencia de la línea . En la Figura 3 se observa la morfología celular en los diferentes tiempos del intervalo usado para evaluar la proliferación celular.

El valor absoluto del número de células el día 14 de crecimiento de las muestras representa la evaluación de la capacidad máxima de crecimiento que tiene la línea y normalmente corresponde a cuando ésta ha alcanzado la fase estacionaria. Los valores de número de células el día 14 de cultivos fueron de 198.186 ± 73.960 células/pocillo (media \pm desviación estándar) en el grupo de pacientes osteoporóticas y de 176.625 ± 24.368 células/pocillo (media \pm desviación estándar) en el grupo control de pacientes no osteoporóticas. Entre los dos grupos no existían diferencias estadísticamente significativas (Tabla2).

Con cada una de las curvas de proliferación celular se calculó el área bajo la curva (AUC). Este parámetro representa la integral de la función curva y es un indicativo muy robusto de la capacidad de crecimiento total que tiene la línea sin tener en cuenta el modelo de crecimiento seguido. Se trata de un valor absoluto que carece de unidades. Los valores de AUC (Área Bajo la Curva) fueron de 1.236 ± 466 (media \pm desviación estándar) en el grupo de pacientes osteoporóticas y de 1.236 ± 429 (media \pm desviación estándar) en el grupo control. Entre los dos grupos no existían diferencias estadísticamente significativas (Tabla 2).

Tabla 2: Cuantificación de la proliferación mediante de curvas de crecimiento celular. Recuento del número de células/pocillo a diferentes tiempos de crecimiento en los dos grupos de estudio (osteoporóticas/ no osteoporóticas). No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de estudio analizados en cada uno de los tiempos donde se ha producido en recuento del número de células. Tampoco se observan diferencias estadísticamente significativas entre los valores de área bajo la curva (AUC) entre los dos grupos.

Proliferación osteoblástica	Osteoporosis	No osteoporosis
N(número de muestras)	9	12
0 horas (n°células/pocillo) X±DE	20.000±0.00	20.000±0.00
48 horas (n°células/pocillo) X±DE	19.951±9.199	22.289±6.047
96 horas (n°células/pocillo) X±DE	36.752±15.896	44.549±15.749
144 horas (n°células/pocillo) X±DE	61.584±28.681	66.907±26.384
192 horas (n°células/pocillo) X±DE	95.719±49.586	10.2453±38.129
264 horas (n°células/pocillo) X±DE	154.319±63.845	146.025±59.113
336 horas (n°células/pocillo) X±DE	198.186±73.960	179.056±85.680
AUC (área bajo curva) X±DE	1.236 ±466	1.236±429

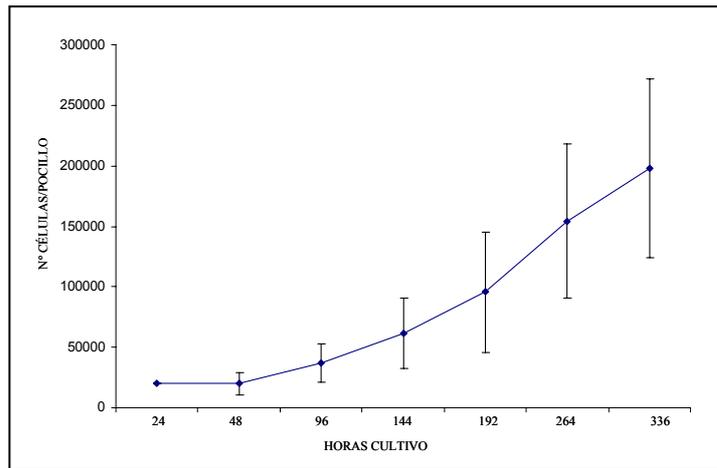


Figura 1: Proliferación osteoblástica del grupo de pacientes osteoporóticas. Se representan las medias y desviación estándar de todas las líneas testadas.

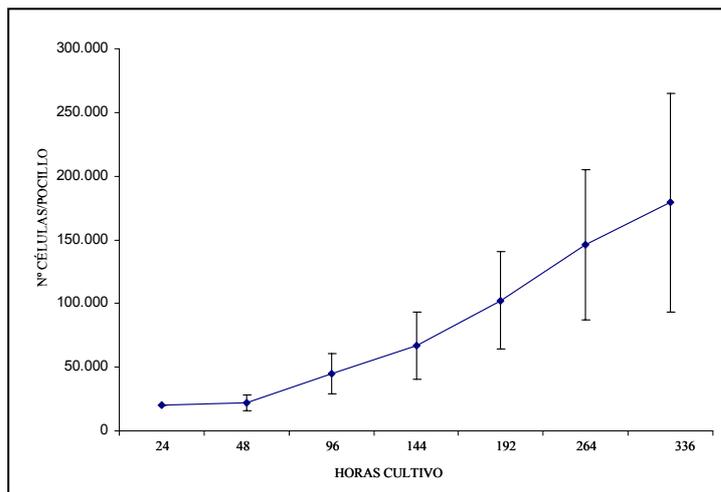


Figura 2: Proliferación osteoblástica del grupo de pacientes no osteoporóticas. Se representan las medias y desviación estándar de todas las líneas testadas.

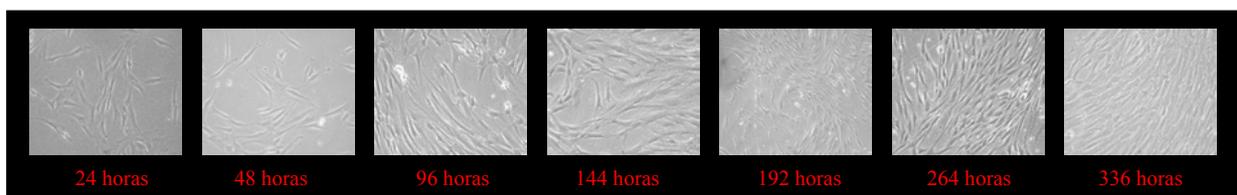


Figura 3: Análisis de la curva de proliferación celular a través de la observación al microscopio (100x) cualitativa de la densidad celular de un cultivo celular a través del tiempo.

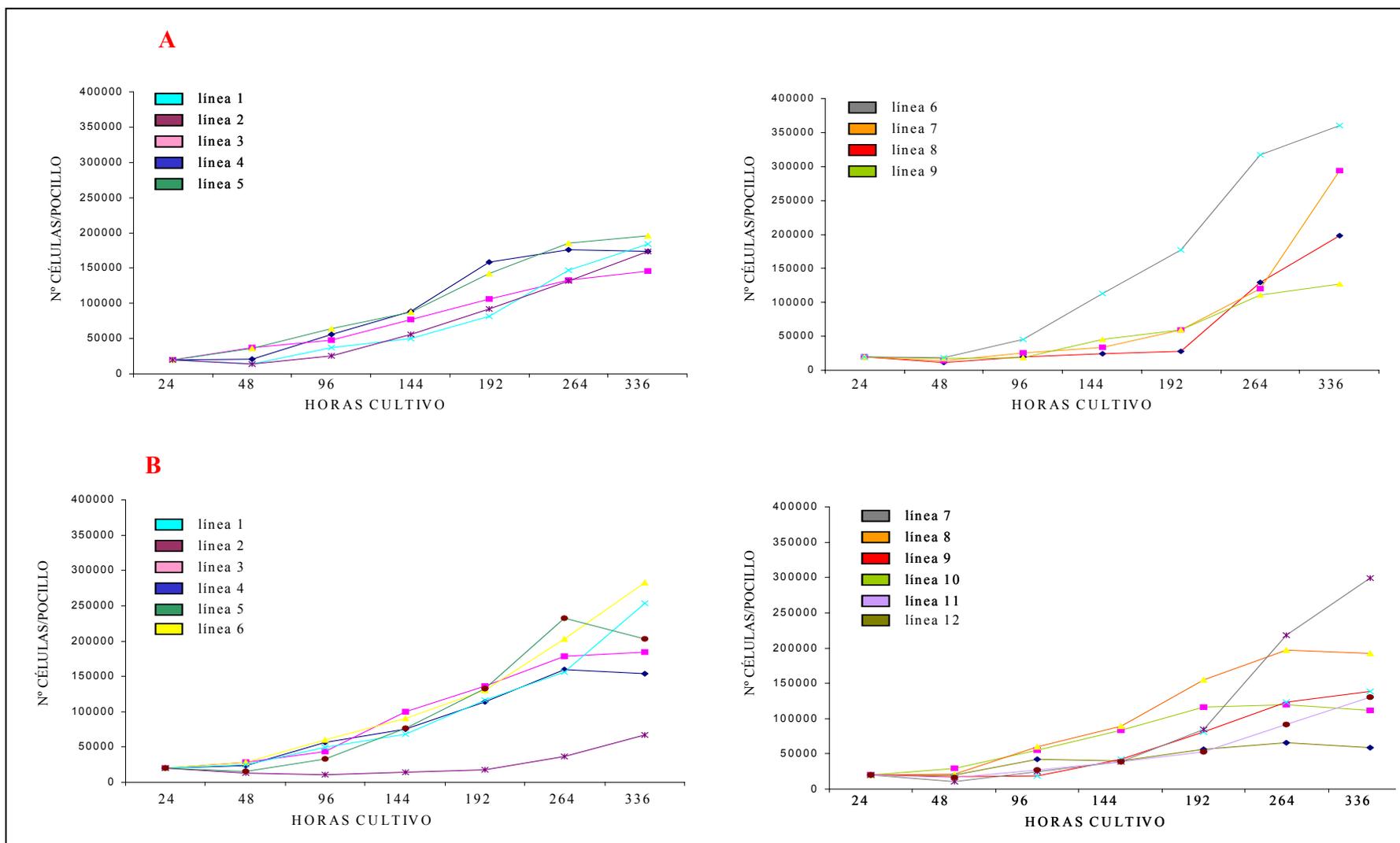


Figura 4: En la gráfica se observan las curvas de proliferación de cada una de las líneas de cultivo primario, separadas en los dos grupos de estudio. **A:** Pacientes osteoporóticas; **B:** Pacientes control no osteoporóticas. En todos los casos se observó el comportamiento típico del crecimiento de una población osteoblástica, con una fase de latencia, una exponencial y una estacionaria. En los gráficos se representa el número de células por pocillo (se representa la media del número de células) en cada uno de los tiempos analizados (24, 48, 96, 144, 192, 264 y 336 horas de cultivo).

1.3 EXPRESIÓN GÉNICA DE LA OPG, RANKL, POLIPÉPTIDO α 1 DEL COLÁGENO TIPO 1 (COL1A1), Cbfa1 Y BMP-2 EN OSTEOLASTOS PRIMARIOS DE PACIENTES MENOPÁUSICAS OSTEOPORÓTICAS Y NO OSTEOPORÓTICAS

El segundo, tercer y cuarto objetivos planteados en este estudio fueron la determinación *in vitro* de los niveles de expresión génica del sistema de regulación del remodelado OPG/RANKL, el polipéptido α 1 del colágeno tipo 1 (COL1A1), la osteocalcina (BGP), la *bone morphogenetic protein-2* (BMP-2) y el factor de transcripción Cbfa1 en las líneas de osteoblastos primarios de pacientes con osteoporosis posmenopáusicas y el grupo de mujeres no osteoporóticas en condiciones basales y analizar si existían diferencias entre los dos grupos. Se realizó la determinación cuantitativa mediante la PCR a tiempo real, de la expresión génica de los transcritos de la OPG, RANKL, COL1A1, osteocalcina, BMP-2 y Cbfa1.

Las células se cultivaron en placas de seis pocillos hasta llegar a la confluencia, se sincronizaron durante 48 horas y posteriormente se incubaron durante 24 en medio de cultivo sin FCS (basal) para evaluar el comportamiento de las células sin la existencia de estímulos externos. Posteriormente a la extracción de RNA y la posterior reacción de la transcriptasa reversa se realizó la PCR a tiempo real para cuantificar los niveles de expresión génica. Las reacciones de PCR a tiempo real se realizaron por triplicado por cada una de las muestras y por cada gen. Los resultados se expresaron en forma de expresión relativa utilizando la β -actina como control endógeno de la reacción (expresión relativa del gen problema = copias del gen problema/copias de β -actina)(Tabla 3)(Figura 5).

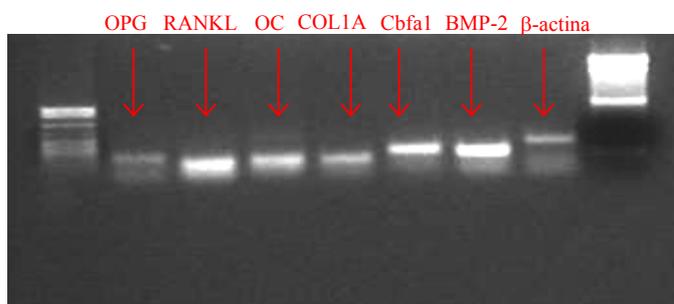


Figura 5: Análisis de la PCR a tiempo real (real time PCR) de la OPG, RANKL, osteocalcina, COL1A1, Cbfa1 y BMP-2. Electroforesis en gel de agarosa 2%.

Tabla 3: Expresión relativa de los genes OPG, RANKL, COL1A1, osteocalcina, Cbfa1, BMP-2 ($\bar{X} \pm$ error estándar), en las líneas celulares de las pacientes osteoporóticas y del grupo control.

* $p < 0.05$ prueba T para la igualdad de medias (test de t de Student)

Gen (expresión relativa) UA (unidades arbitrarias)	Osteoporosis (9)	No osteoporosis(12)	P (test de t de Student)
OPG	1.91±0.66	3.75±1.16	0.022*
RANKL	0.97±0.31	0.76±0.26	0.685
COL1A1	1.29±0.39	2.29±0.28	0.049*
Osteocalcina	1.38±0.15	0.88±0.17	0.053
Cbfa1	2.13±0.35	2.24±0.30	0.810
BMP-2	1.64±0.32	1.20±0.20	0.232

1.3.1 Expresión génica de la OPG en osteoblastos primarios de pacientes menopáusicas osteoporóticas y no osteoporóticas

1.3.1.1 Detección de la expresión génica de OPG en osteoblastos primarios procedentes de mujeres menopáusicas osteoporóticas y no osteoporóticas

Con anterioridad a la cuantificación de los niveles de expresión génica de la osteoprotegerina se procedió a la detección de la presencia de transcritos del gen de la OPG por parte de los osteoblastos primarios en condiciones de cultivo basales para todas las muestras procedentes de las pacientes incluidas en el estudio. Como control endógeno de la reacción se utilizó la β -actina.

Todas las líneas celulares analizadas en el presente estudio expresaban OPG en condiciones basales de cultivo. En la figura 6 se observa el análisis cualitativo de la expresión génica de la OPG en condiciones basales de 6 muestras de pacientes del grupo de mujeres menopáusicas con osteoporosis y 7 muestras procedentes de pacientes menopáusicas no osteoporóticas. No se analizó la expresión génica de la totalidad de las líneas celulares incluidas en el estudio ya que se consideró una muestra representativa de la población.

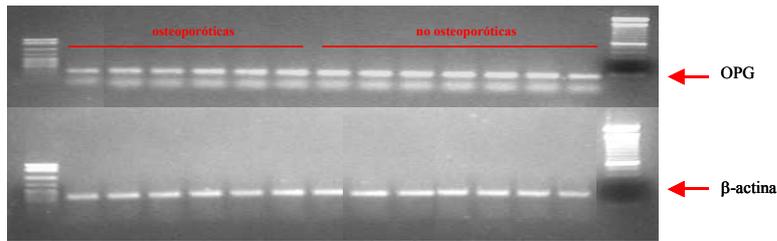


Figura 6: Análisis de la RT-PCR de los transcritos del gen de la OPG. La banda superior corresponde al fragmento amplificado de la OPG. Se utilizó la β-actina como control endógeno de la reacción.

1.3.1.2 Cuantificación de la expresión génica de OPG en osteoblastos primarios procedentes de mujeres menopáusicas osteoporóticas y no osteoporóticas

En el análisis cuantitativo de la expresión génica de la osteoprotegerina en los dos grupos de pacientes del estudio (9 pacientes pertenecientes al grupo de mujeres menopáusicas con osteoporosis y 12 del grupo de pacientes menopáusicas no osteoporóticas) se obtuvieron valores significativamente inferiores en el grupo de pacientes osteoporóticas en condiciones de cultivo basales ($p=0.022$, test de t de Student) (Tabla 3)(Figura 7).

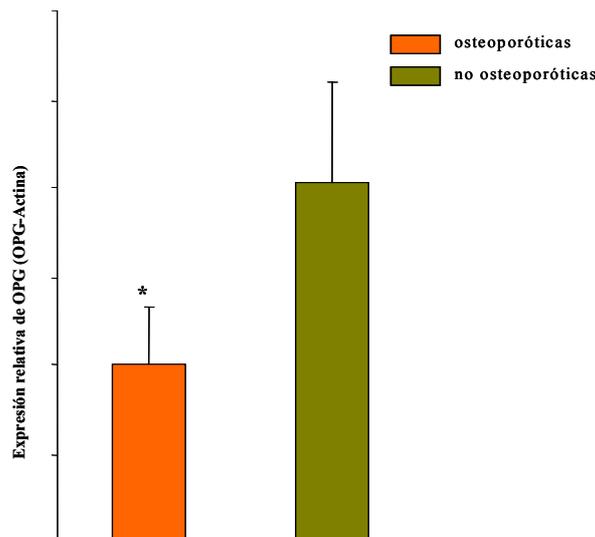


Figura 7: Niveles relativos de expresión génica de OPG (media ± error estándar) en condiciones basales (sin FCS). * $p<0.05$ prueba T para la igualdad de medias (test de t de Student)

1.3.1.3 Efecto de la vitamina D y el 17 β -estradiol sobre la expresión génica de la OPG en osteoblastos primarios de pacientes menopáusicas osteoporóticas y no osteoporóticas

OPG (expresión relativa) UA(unidades arbitrarias)	Osteoporosis (9)	no osteoporosis(12)	P (test de t de Student)
basal	1.91 \pm 0.66	3.75 \pm 1.16	0.022*
Vitamina D	1.50 \pm 0.32	2.41 \pm 0.51	0.026*
17β-estradiol	1.12 \pm 0.17	2.95 \pm 0.69	0.012*
FCS	1.07 \pm 0.46	2.38 \pm 0.50	0.117

Tabla 4: Expresión relativa de la OPG ($X \pm$ error estándar), en las líneas celulares de las pacientes osteoporóticas y del grupo control.

* $p < 0.05$ prueba T para la igualdad de medias (test de t de Student)

Con el objetivo de determinar cuantitativamente si existía una expresión génica diferencial por parte de los osteoblastos entre el grupo de pacientes osteoporóticas y el grupo control de pacientes no osteoporóticas cuando los osteoblastos eran estimulados con vitamina D y 17 β -estradiol se realizó la determinación cuantitativa por PCR a tiempo real de la expresión génica de la OPG. Las células se cultivaron en placas de seis pocillos hasta llegar a la confluencia, se sincronizaron durante 48 horas y posteriormente se incubaron durante 24 en medio de cultivo sin FCS (basal), con 10% FCS y 10⁻⁸M de vitamina D y 367mM de 17 β -estradiol. Posteriormente a la extracción de RNA y la reacción de la transcriptasa reversa se realizó la PCR a tiempo real para cuantificar los niveles de expresión génica. Las reacciones de PCR a tiempo real se realizaron por triplicado por cada una de las muestras y de los genes. Los resultados se expresaron en forma de expresión relativa utilizando la β -actina como control endógeno (expresión relativa de OPG = copias OPG/copias de β -actina).

En los cultivos estimulados con vitamina D se obtuvieron niveles de expresión génica de OPG significativamente menores en el grupo de pacientes osteoporóticas ($p=0.026$, test de t de Student) (Tabla 4).

Cuando se estimularon las células osteoblásticas en cultivo con 17 β -estradiol se obtuvieron niveles de expresión génica de OPG inferiores en el grupo de pacientes osteoporóticas ($p=0.012$, test de t de Student) (Tabla 4).

1.3.2 Expresión génica de RANKL en osteoblastos primarios de pacientes menopáusicas osteoporóticas y no osteoporóticas

1.3.2.3 Detección de la expresión génica de RANKL en osteoblastos primarios procedentes de mujeres menopáusicas osteoporóticas y no osteoporóticas

Para realizar la cuantificación de los niveles de expresión génica de RANKL se comprobó si se detectaba la presencia de transcritos de RANKL en los osteoblastos primarios en condiciones de cultivo basales para todas las muestras procedentes de las pacientes incluidas en el estudio. Como control endógeno de la reacción se utilizó la β -actina.

Tras el análisis de la expresión génica se observó que en todas las líneas celulares analizadas en el presente estudio se detectaba expresión de RANKL en condiciones basales de cultivo. En la figura 8 se observa el análisis cualitativo de la expresión génica de RANKL en condiciones basales de 6 muestras de pacientes del grupo de mujeres menopáusicas con osteoporosis y 7 muestras procedentes de pacientes menopáusicas no osteoporóticas. No se realizó la comprobación de la expresión génica en todas las muestras de osteoblastos incluidas, solamente se consideró una muestra representativa de la población total. Las bandas de la parte superior de la figura 8 corresponden a los transcritos del RANKL. En todos los casos las bandas presentan un aspecto difuso a la parte inferior, debido a que se trata de un producto amplificado de un tamaño muy pequeño y la banda queda poco separada de los remanentes de “primer” de la reacción.

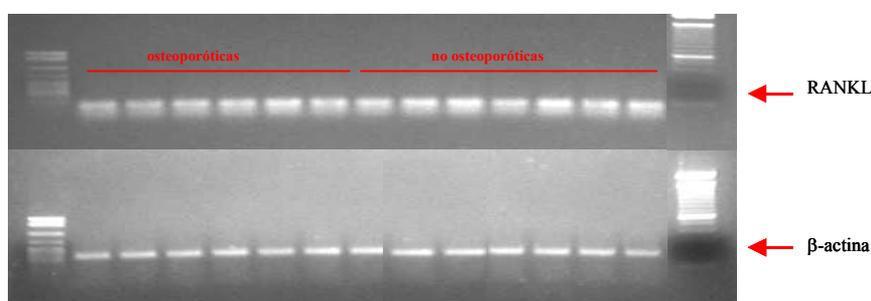


Figura 8: Análisis de la PCR *real time* de los transcritos del gen de la RANKL. La banda superior corresponde al fragmento amplificado de la RANKL. Se utilizó la β -actina como control endógeno de la reacción.

1.3.2.2 Cuantificación de la expresión génica de RANKL en osteoblastos primarios procedentes de mujeres menopáusicas osteoporóticas y no osteoporóticas

Los resultados obtenidos en la cuantificación de los niveles de expresión génica del RANKL en los dos grupos de pacientes del estudio (9 pacientes pertenecientes al grupo de mujeres menopáusicas con osteoporosis y 12 del grupo de pacientes menopáusicas no osteoporóticas) fueron equivalentes en los dos grupos, no existiendo diferencias estadísticamente significativas (Tabla 3)(Figura 9).

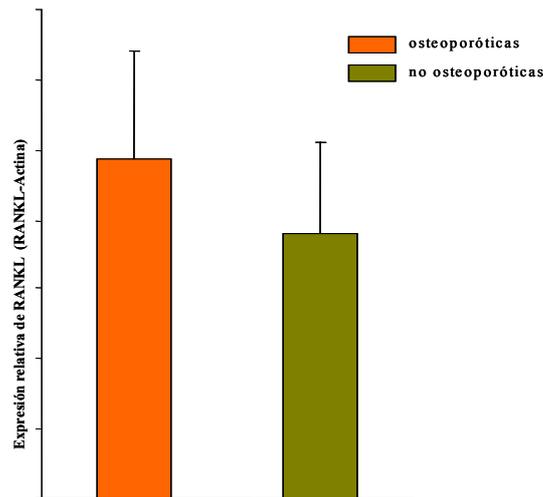


Figura 9: Niveles relativos de expresión génica de RANKL (media \pm error estándar) en condiciones basales (sin FCS).

1.3.2.4 Efecto de la vitamina D y el 17β -estradiol sobre la expresión génica de la RANKL en osteoblastos primarios de pacientes menopáusicas osteoporóticas y no osteoporóticas

RANKL(expresión relativa) UA(unidades arbitrarias)	Osteoporosis (9)	No osteoporosis(12)	P (test de t de Student)
Basal	0.97 \pm 0.31	0.76 \pm 0.26	0.685
Vitamina D	1.03 \pm 0.25	1.14 \pm 0.45	0.502
17β-estradiol	0.48 \pm 0.05	0.904 \pm 0.41	0.356
FCS	1.38 \pm 0.82	1.37 \pm 0.51	0.945

Tabla 5: Expresión relativa de la RANKL (\bar{X} \pm error estándar), en las líneas celulares de las pacientes osteoporóticas y del grupo control.

Bajo estimulación con vitamina D y 17β -estradiol se determinó cuantitativamente la existencia de diferencias en la expresión génica de RANKL entre el grupo de pacientes osteoporóticas y el grupo control de pacientes no osteoporóticas. La cuantificación se realizó mediante PCR a tiempo real. Las células se cultivaron en placas de seis pocillos hasta llegar a la confluencia, se sincronizaron durante 48 horas y posteriormente se incubaron durante 24 en medio de cultivo sin FCS (basal), con 10% FCS, 10^{-8} M de vitamina D y 367mM de 17β -estradiol. Posteriormente a la extracción de RNA y la reacción de la transcriptasa reversa se realizó la PCR a tiempo real para cuantificar los niveles de expresión génica. Las reacciones de PCR a tiempo real se realizaron por triplicado por cada una de las muestras y de los

genes. Los resultados se expresaron en forma de expresión relativa utilizando la β -actina como control endógeno (expresión relativa de RANKL = copias RANKL/copias de β -actina).

Los resultados obtenidos indicaban que en los osteoblastos bajo la estimulación de la vitamina D y el 17β -estradiol no se obtuvieron niveles de expresión génica diferenciales al comparar los dos grupos de estudio ya que no presentaban diferencias estadísticamente significativas entre ellos (Tabla 5).

1.3.3 Expresión génica del polipéptido $\alpha 1$ del colágeno tipo 1 (COL1A1) en osteoblastos primarios de pacientes menopáusicas osteoporóticas y no osteoporóticas

1.3.3.3 Cuantificación de la expresión génica del COL1A1 en osteoblastos primarios procedentes de mujeres menopáusicas osteoporóticas y no osteoporóticas

Previamente a la cuantificación de los niveles de expresión génica del polipéptido $\alpha 1$ del colágeno tipo 1 se corroboró la expresión génica de COL1A1 en condiciones basales por parte de los osteoblastos mediante la detección de la presencia de transcritos del gen de la COL1A1 usando las condiciones experimentales de la *real time* PCR para las muestras procedentes de las pacientes incluidas en el estudio. Como control endógeno de la reacción se utilizó la β -actina.

En todas las líneas celulares analizadas en el presente subestudio se detectó expresión génica de COL1A1 en condiciones basales de cultivo. En la figura 10 aparece la detección cualitativa de la expresión génica del COL1A1 en condiciones basales de 6 muestras de pacientes del grupo de las mujeres menopáusicas con osteoporosis y 7 muestras procedentes de pacientes menopáusicas no osteoporóticas. No se realizó la detección de la expresión génica de todas las líneas celulares del subestudio ya que se consideró solamente una muestra representativa de la población.

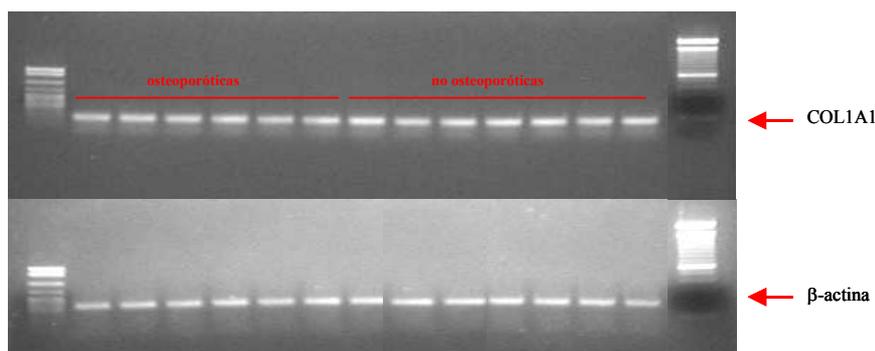


Figura 10: Análisis de la PCR *real time* de los transcritos del gen del COL1A1. La banda superior corresponde al fragmento amplificado del COL1A1. Se utilizó la β -actina como control endógeno de la reacción.

1.3.3.2 Cuantificación de la expresión génica de COL1A1 en osteoblastos primarios procedentes de mujeres menopáusicas osteoporóticas y no osteoporóticas

Al realizar la cuantificación de los niveles la expresión génica del COL1A1 en los dos grupos de pacientes del estudio (9 pacientes pertenecientes al grupo de mujeres menopáusicas con osteoporosis y 12 del grupo de pacientes menopáusicas no osteoporóticas) se obtuvieron valores significativamente inferiores en el grupo de pacientes osteoporóticas en condiciones de cultivo basales ($p=0.049$, test de t de Student), por lo tanto se puede afirmar que los osteoblastos procedentes de pacientes con osteoporosis posmenopáusica expresan menor cantidad de transcritos del COL1A1 (Tabla 3)(Figura 11).

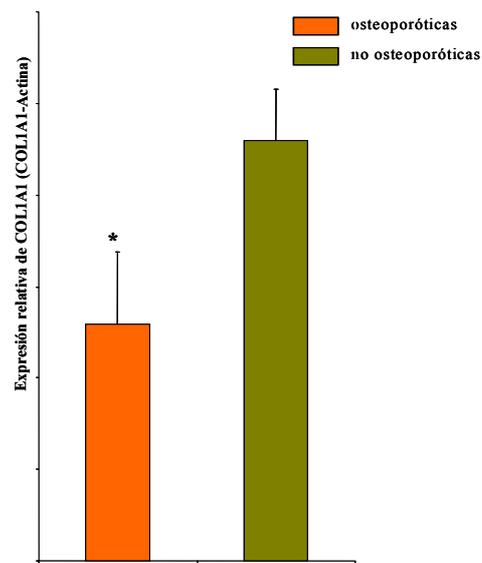


Figura 11: Niveles relativos de expresión génica de COL1A1 (media ± error estándar) en condiciones basales (sin FCS). * $p<0.05$ prueba T para la igualdad de medias (test de t de Student)

1.3.4 Expresión génica de la osteocalcina en osteoblastos primarios de pacientes menopáusicas osteoporóticas y no osteoporóticas

1.3.4.3 Cuantificación de la expresión génica de la osteocalcina en osteoblastos primarios procedentes de mujeres menopáusicas osteoporóticas y no osteoporóticas

Anteriormente a la cuantificación de los niveles de expresión génica de osteocalcina se procedió a la detección de la presencia de transcritos del gen de la osteocalcina generados por los osteoblastos primarios en condiciones basales de cultivo para todas las muestras procedentes de las pacientes incluidas en el estudio. La detección de expresión génica por parte de los osteoblastos de las muestras de estudio se había realizado en la caracterización de las líneas celulares pero no en las condiciones experimentales usadas para la PCR a tiempo real. Como control endógeno de la reacción se utilizó la β -actina.

Todas las líneas celulares analizadas en el presente estudio expresaban la osteocalcina en condiciones basales de cultivo. En la figura 12 se observa el análisis cualitativo de la expresión génica de la osteocalcina en condiciones basales de 6 muestras de pacientes del grupo de mujeres menopáusicas con osteoporosis y 7 muestras procedentes de pacientes menopáusicas no osteoporóticas. Se analizó la expresión génica de todas las líneas celulares incluidas en el estudio ya que se consideró una muestra representativa de la población. La banda de la parte superior de la figura 12, correspondiente a los transcritos de osteocalcina, presenta un aspecto difuso en la parte inferior, debido a que se trata de un producto amplificado de un tamaño muy pequeño y la banda queda poco separada de los remanentes de “primer” de la reacción.

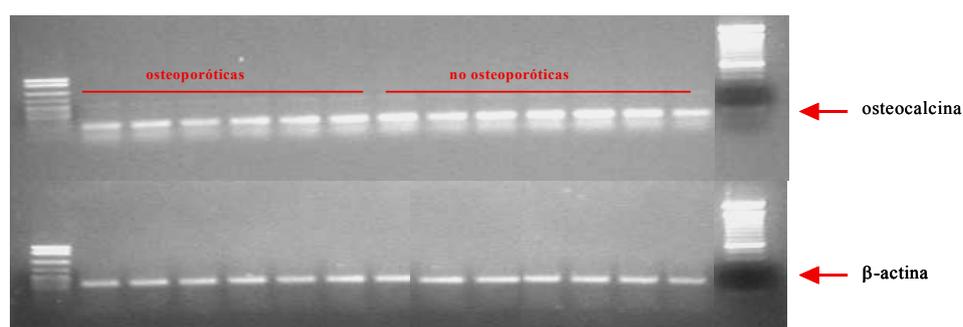


Figura 12: Análisis de la PCR *real time* de los transcritos del gen de la osteocalcina. La banda superior corresponde al fragmento amplificado de la osteocalcina. Se utilizó la β-actina como control endógeno de la reacción.

1.3.3.2 Cuantificación de la expresión génica de la osteocalcina en osteoblastos primarios procedentes de mujeres menopáusicas osteoporóticas y no osteoporóticas

En los resultados obtenidos en la cuantificación de los niveles de expresión génica de la osteocalcina en los dos grupos de pacientes del estudio (9 pacientes pertenecientes al grupo de mujeres menopáusicas con osteoporosis y 12 del grupo de pacientes menopáusicas no osteoporóticas) se observó una tendencia al aumento de la expresión génica de la osteocalcina en el grupo de pacientes osteoporóticas sin que alcanzara significación estadística ($p=0.053$, test de t de Student) (Tabla 3)(figura 13).

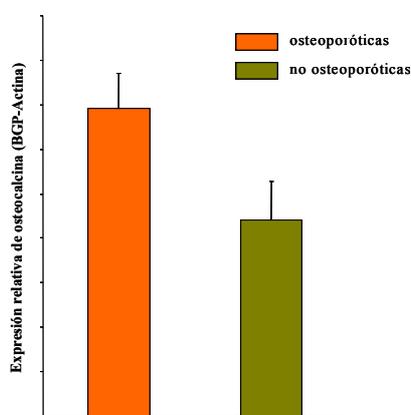


Figura 13: Niveles relativos de expresión génica de la osteocalcina (media \pm error estándar) en condiciones basales (sin FCS).

1.3.5 Expresión génica del Cbfa1 en osteoblastos primarios de pacientes menopáusicas osteoporóticas y no osteoporóticas

1.3.5.3 Cuantificación de la expresión génica del Cbfa1 en osteoblastos primarios procedentes de mujeres menopáusicas osteoporóticas y no osteoporóticas

Antes de realizar la cuantificación de los niveles de expresión génica de Cbfa1 se procedió a la detección de la presencia de transcritos del Cbfa1 por parte de los osteoblastos primarios en condiciones basales de cultivo para las muestras procedentes de las pacientes incluidas en el subestudio. Como control endógeno de la reacción se utilizó la β -actina.

Se detectó expresión génica de Cbfa1 en condiciones basales de cultivo en todas las líneas celulares analizadas en el presente subestudio. En la figura 14 se observa el análisis cualitativo de la expresión génica del Cbfa1 en condiciones basales de 6 muestras de pacientes del grupo de las mujeres menopáusicas con osteoporosis y 7 muestras procedentes de pacientes menopáusicas no osteoporóticas. No se analizó la expresión génica de todas las líneas celulares incluidas en el estudio ya que se consideró una muestra representativa de la población.

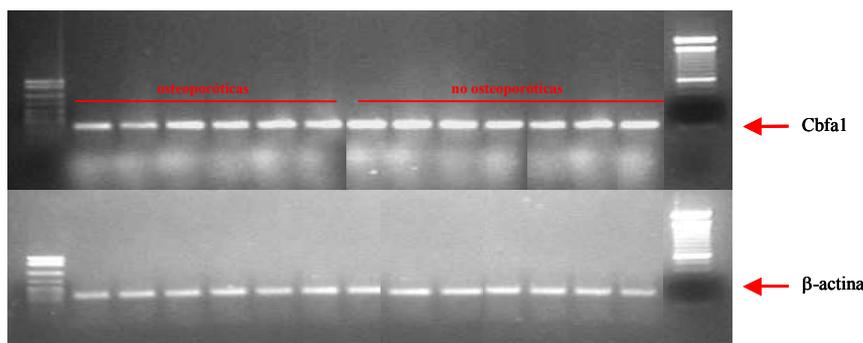


Figura 14: Análisis de la RT-PCR de los transcritos del gen del Cbfa1. La banda superior corresponde al fragmento amplificado del Cbfa1. Se utilizó la β -actina como control endógeno de la reacción.

1.3.5.2 Cuantificación de la expresión génica del Cbfa1 en osteoblastos primarios procedentes de mujeres menopáusicas osteoporóticas y no osteoporóticas

Al cuantificar la expresión génica de Cbfa1 en los dos grupos de pacientes del estudio (9 pacientes pertenecientes al grupo de mujeres menopáusicas con osteoporosis y 12 del grupo de pacientes menopáusicas no osteoporóticas) los resultados fueron equivalentes en los dos grupos, no existiendo diferencias estadísticamente significativas (Tabla 3) (Figura 15).

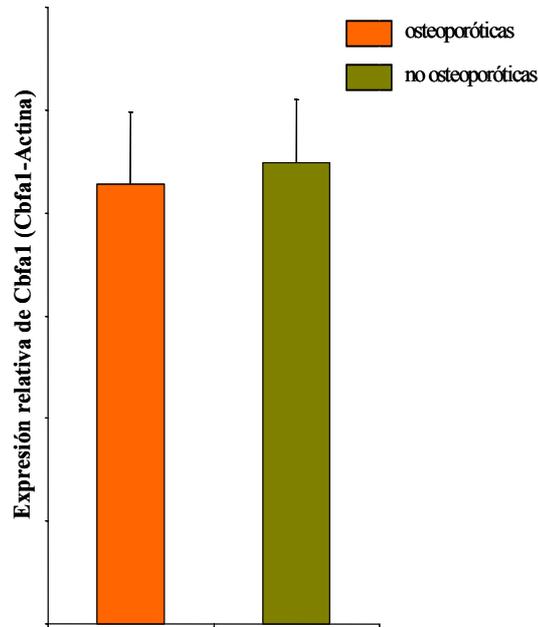


Figura 15: Niveles relativos de expresión génica de Cbfa1 (media \pm error estándar) en condiciones basales (sin FCS).

1.3.6 Expresión génica de la *bone morphogenetic protein-2* (BMP-2)

1.3.6.1 Cuantificación de la expresión génica de la BMP-2 en osteoblastos primarios procedentes de mujeres menopáusicas osteoporóticas y no osteoporóticas

Como paso previo a realizar la cuantificación de la expresión génica de la BMP-2 se realizó una comprobación de la presencia de expresión génica de BMP-2 por parte de los osteoblastos de las muestras sometidas a estudio. Como control endógeno de la reacción se utilizó la β -actina.

Los resultados fueron que las líneas celulares analizadas en el presente estudio expresaban BMP-2 en condiciones basales de cultivo. En la figura 14 aparece el análisis cualitativo de la expresión génica de la osteocalcina en condiciones basales de 6 muestras de pacientes del grupo de mujeres menopáusicas con osteoporosis y 7 muestras procedentes de pacientes menopáusicas no osteoporóticas. No se analizó la expresión génica de todas las líneas celulares incluidas en el estudio ya que se consideró una muestra representativa de la población.

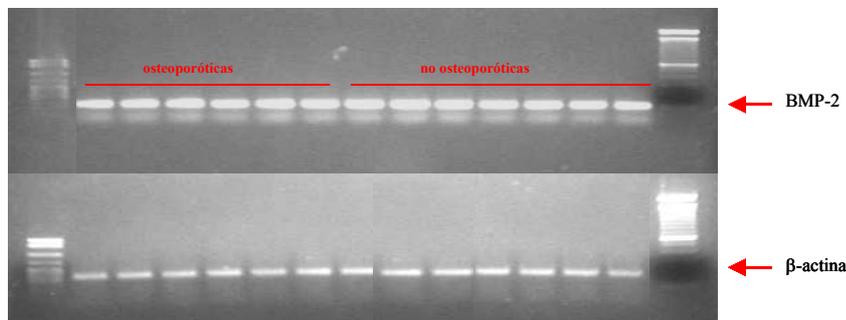


Figura 16: Análisis de la PCR *real time* de los transcritos del gen de la BMP-2. La banda superior corresponde al fragmento amplificado de la BMP-2. Se utilizó la β -actina como control endógeno de la reacción.

1.3.5.2 Cuantificación de la expresión génica del BMP-2 en osteoblastos primarios procedentes de mujeres menopáusicas osteoporóticas y no osteoporóticas

En el análisis de la expresión génica de la BMP-2 en los dos grupos de pacientes del estudio (9 pacientes pertenecientes al grupo de mujeres menopáusicas con osteoporosis y 12 del grupo de pacientes menopáusicas no osteoporóticas) los resultados obtenidos indican que no existían diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión génica (Tabla 3)(Figura 17).

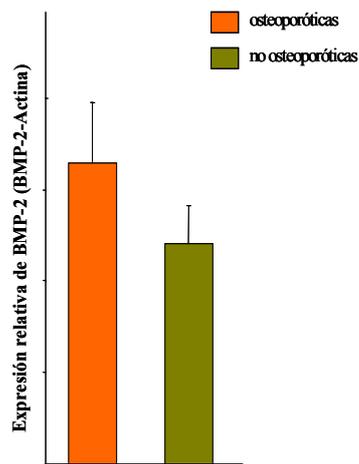


Figura 17: las gráficas indican los niveles relativos de expresión génica de BMP-2 (media \pm error estándar) en condiciones basales (sin FCS).

2. DISCUSIÓN

El presente subestudio fue diseñado con el objetivo de determinar la existencia de una patología osteoblástica como un posible mecanismo de explicación de la osteoporosis posmenopáusica. Para abordar el análisis de la patología osteoblástica intrínseca en este tipo de pacientes se analizaron los dos aspectos más importantes a considerar en la función celular: su capacidad proliferativa y su actividad funcional. En esta dirección, a través de las determinaciones realizadas en el presente trabajo, se encontró que la actividad funcional de los osteoblastos se encontraba disminuida en las pacientes menopáusicas con osteoporosis.

A partir de la evidencia científica que postula que las mujeres con osteoporosis posmenopáusica tienen alteraciones en la funcionalidad de las células óseas que provocan un balance del remodelado óseo a favor de la resorción ósea y teniendo en cuenta los hallazgos publicados en la literatura, donde encontramos ampliamente descritos los procesos que implican este proceso y los factores que intervienen, se diseñó el presente estudio con la intención de valorar distintos aspectos de la funcionalidad de los osteoblastos en un modelo *in vitro* de cultivo de osteoblastos primarios de pacientes afectas de osteoporosis posmenopáusica. A partir de la premisa de que el cultivo primario de osteoblastos humanos derivados de hueso trabecular es el mejor modelo para el estudio de anomalías intrínsecas de las células óseas de pacientes con enfermedades metabólicas óseas (ya discutido en el primer subestudio y confirmado por algunos autores [Wong y col., 1994]), la idea genuina de este trabajo fue estudiar el osteoblasto como posible determinante patológico de la enfermedad. En estudios realizados con pacientes con osteoporosis idiopática los resultados histomorfométricos demostraron que el osteoblasto osteoporótico presentaba un defecto funcional intrínseco [Darby y col., 1981],[Arlot y col., 1984] y [Parfitt y col., 1992]. En el presente trabajo la hipótesis básica suponía que el osteoblasto de las mujeres posmenopáusicas tenía un defecto intrínseco independientemente de los factores sistémicos y paracrinos que lo condicionan *in vivo* en el seno del tejido óseo. Estos defectos de “*imprinting*” o “*background*” genético permanecerían en las células y por lo tanto se podrían detectar en un modelo aislado de cultivo celular *in vitro*. Asimismo se debería identificar un funcionamiento diferencial de los osteoblastos procedentes de mujeres con osteoporosis posmenopáusica cuando estos no estaban expuestos a agentes externos que los estimulaban o los inhibían. El presente trabajo se diseñó con la intención de identificar diferentes marcadores de funcionalidad celular relacionados con los osteoblastos. Los parámetros que se tuvieron en cuenta fueron la proliferación osteoblástica y la expresión génica de grupos de genes implicados en la regulación de la diferenciación y actividad osteoclástica (OPG y RANKL), en la diferenciación osteoblástica (Cbfa1 y BMP-2) y en la formación de la matriz ósea (polipéptido $\alpha 1$ del colágeno tipo 1 y osteocalcina).

2.1 PROLIFERACIÓN OSTEABLÁSTICA

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que no se produce una disminución de la proliferación celular en las pacientes con osteoporosis posmenopáusicas. La proliferación celular es un parámetro funcional de los osteoblastos que es importante tener en cuenta cuando se realiza un estudio exhaustivo de la posible implicación de estas células en la patogénesis de la osteoporosis.

Existen muchos genes implicados en el proceso de división celular y en la regulación de estos intervienen gran cantidad de factores de origen físico y químico procedentes de la propia célula que se divide, de las células contiguas o de factores sistémicos que desembocan en una acción local ya sea por ellos mismos o a través de un factor paracrino. Para abordar el tema pareció necesario realizar en primera instancia una evaluación global del proceso de proliferación celular en términos absolutos para investigar la existencia de patología asociada a este aspecto de la actividad osteoblástica. Las curvas de proliferación celular aportaron la información necesaria para detectar la presencia de patologías asociadas a la división de las células como conjunto poblacional de células que actúan con sinergismo. De esta forma se pudieron evaluar las líneas celulares de forma individualizada determinando el modelo de crecimiento general a través del tiempo.

Existen precedentes en la literatura donde se han realizado estudios de proliferación celular y los resultados se encuentran muy controvertidos. *Wong y col., 1994* realizaron un estudio comparativo mediante cultivo primario de osteoblastos trabeculares de un grupo mixto de 14 varones y 4 mujeres con osteoporosis separados por grupos de edad y comparado con un grupo control. No se encontraron diferencias significativas en la capacidad proliferativa entre el grupo osteoporótico y el control [Wong y col., 1994]. En un segundo estudio, observaron un efecto de la edad en el número de células al llegar a la confluencia [Evans y col., 1990]. Otros estudios, encontraron una disminución en la síntesis de DNA en cultivo primario de pacientes con osteoporosis posmenopáusicas y en varones con osteoporosis idiopática [Marie y col., 1989] y [Marie y col., 1991].

En nuestros resultados no se observó que el defecto intrínseco de los osteoblastos afectara a la proliferación celular en las pacientes con patología osteoporótica. En las curvas de crecimiento celular no se detectó una disminución significativa de la proliferación en los osteoblastos osteoporóticos, contrariamente al estudio publicado en la literatura con pacientes con osteoporosis posmenopáusicas por Marie [Marie y col., 1989].

Los resultados obtenidos en el presente estudio permitieron descartar que el posible defecto osteoblástico afectara a la normalidad del ciclo celular de los osteoblastos maduros pero no permitió descartar defectos relacionados con el conjunto de osteoblastos disponibles presentes en las superficies óseas que indicarían un defecto en el reclutamiento de los preosteoblastos. Para el análisis de proliferación utilizado en el presente trabajo se partió del mismo número de osteoblastos iniciales pero *in vivo* existiría la posibilidad

de que el defecto en la actividad osteoblástica descrita también en la literatura mediante estudios histomorfométricos [Darby y col., 1981],[Arlot y col., 1984] y [Parfitt y col., 1992] fuera debido a que las superficies de hueso trabecular de las pacientes que padecen osteoporosis tuvieran un número reducido de este tipo celular debido a un defecto producido en el reclutamiento de las células mesenquimales que quedarían marcadas para diferenciarse en osteoblastos maduros activos. Por este motivo se considera que no se tiene suficiente información para afirmar que no existe ningún defecto osteoblástico relacionado con el proceso de proliferación celular en todas las etapas de la diferenciación osteoblástica.

En trabajos futuros sería necesario desglosar este análisis en estudios más exhaustivos a nivel tisular y molecular. Por ejemplo se debería completar el estudio realizando un recuento del número de osteoblastos presentes en los frentes de crecimiento y/o reparación del hueso analizando el tejido fresco mediante técnicas histológicas, analizar la expresión génica de factores de transcripción y genes implicados en las primeras fases de la diferenciación osteoblástica, realizar análisis de la expresión de genes implicados en el proceso de apoptosis y realizar técnicas de apoptosis propiamente dichas para detectar posibles disminuciones en el número de osteoblastos debidos a un proceso de apoptosis defectuoso.

2.2 EXPRESIÓN GÉNICA DE OPG Y RANKL

Los resultados obtenidos a partir de la determinación de los niveles relativos de expresión génica de OPG y RANKL en condiciones basales sin FCS en el medio mostraron una disminución de la expresión génica de OPG en el grupo de pacientes con osteoporosis posmenopáusicas. Esta disminución no se observa en los niveles de expresión génica del RANKL. De esta manera, si en las líneas primarias procedentes de pacientes con osteoporosis posmenopáusicas se produjo una disminución de los niveles de expresión génica de OPG y un mantenimiento de los niveles de expresión génica del RANKL, ello dio como consecuencia un aumento del cociente RANKL/OPG que es el parámetro que determina la diferenciación y activación de los osteoclastos. El aumento del cociente determinaría que existiera más cantidad de RANKL libre que no se encontraría unido a su receptor señuelo OPG y por lo tanto podría interaccionar con su receptor osteoclástico RANK, favoreciéndose la diferenciación de los precursores de osteoclastos, la fusión de estos formando células multinucleadas (osteoclastos maduros) y finalmente la activación de estos osteoclastos. El balance global de este mecanismo de patogénesis intrínseca de los osteoblastos osteoporóticos quedaría plasmado en un aumento de la resorción con el consiguiente resultado clínico de osteoporosis con disminución de la DMO y disminución de la calidad ósea con propensión a fracturas osteoporóticas.

Para el estudio del sistema de regulación proteico protagonizado por OPG y RANKL en pacientes con osteoporosis posmenopáusicas se utilizó como modelo el cultivo primario de osteoblastos humanos procedentes de fragmentos de hueso trabecular. En la literatura hasta el momento no existían trabajos en

modelos de cultivo primario de un grupo de pacientes con osteoporosis posmenopáusica en que se analizase la expresión génica del sistema OPG/RANKL.

A la luz de los estudios publicados en la literatura consideramos que este sistema de regulación estaba muy estudiado ya que en estudios *in vitro* se han analizado los efectos que tienen los distintos factores sobre la expresión génica tanto de la OPG como del RANKL, tanto en cultivo primario como en líneas celulares tumorales de humanos y de roedores. Por este motivo en nuestro estudio se pretendía analizar si en un modelo de osteoblastos primarios procedentes de pacientes con osteoporosis posmenopáusica frente a pacientes no osteoporóticas, existían diferencias en los niveles de expresión génica de ambos genes entre los dos grupos.

2.5 EFECTO DE LA VITAMINA D Y EL 17 β -ESTRADIOL SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LA OPG Y EL RANKL

Los estudios realizados indicaron que los osteoblastos procedentes de muestras osteoporóticas, bajo la estimulación con vitamina D y 17 β -estradiol producen niveles inferiores de expresión génica que los osteoblastos de los controles.

El efecto de la vitamina D en el tejido diana parece estar mediado a través de una acción parecida a las otras hormonas esteroideas [Manolagas y col., 1983]. En este proceso el esteroide primero se une al receptor citoplasmático específico (*calcium-binding protein*), posteriormente el complejo hormona-receptor es translocado al núcleo donde comienza la síntesis de RNA. Estudios realizados en células ROS 17/2-8 demuestran el efecto estimulador de la vitamina D sobre la actividad fosfatasa alcalina. También demostraron que la concentración de vitamina D que conseguía mayor estimulación era la de 10⁻⁸M [Manolagas y col., 1983]. Parece ser que la concentración más estimuladora coincide con las concentraciones fisiológicas. De esta manera aplicando esta concentración en el medio de cultivo podemos determinar el efecto que tiene la vitamina D sobre los osteoblastos en condiciones fisiológicas.

Se ha visto que la vitamina D estimula la expresión génica de OPG en cultivo celular de osteoblastos fetales humanos (hFOB) y cultivo primario de osteoblastos trabeculares humanos (hOB) así como la expresión génica de RANKL en osteoblastos primarios de murinos y en las líneas celulares del estroma medular (ST-2, tsJ2 y KUSA/O), al tiempo que inhibía la expresión génica de OPG en las líneas celulares del estroma medular (ST-2, y tsJ2) y en osteoblastos primarios murinos [revisado en Hofbauer 1999].

Los resultados obtenidos en el presente estudio resultaron concordantes con los observados en la literatura donde se describía que la vitamina D inhibe la expresión de OPG ya que a pesar de y no ser estadísticamente significativa la expresión génica de OPG bajo el estímulo de la vitamina D, resultó ser inferior a la obtenida en condiciones basales, tanto en el grupo de pacientes osteoporóticas como en el grupo control de pacientes no osteoporóticas.

En la comparación de la expresión génica de OPG entre los dos grupos analizados resultó ser significativamente superior en el grupo de pacientes no osteoporóticas. Estos resultados reafirman la

hipótesis anteriormente expuesta donde se evidenciaba la presencia de un defecto en la expresión génica de la osteoprotegerina en las pacientes afectadas de osteoporosis posmenopáusica.

En el análisis de la expresión génica del RANKL se observó una concordancia con los hallazgos publicados en la literatura hasta el momento donde se observa un efecto estimulador de la expresión génica del RANKL bajo el estímulo de concentraciones fisiológicas de vitamina D (10^{-8} M) ya que en los dos grupos de estudio se observaron unos niveles de expresión génica superiores a los observados en condiciones basales. Estos resultados no alcanzaron significación estadística pero si permitieron afirmar en el modelo de estudio utilizado el efecto anabólico de la vitamina D en la expresión génica del RANKL. En la comparación de la expresión génica del RANKL entre los dos grupos analizados no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados aportan nuevos datos en la intención de profundizar en el estudio de la disfunción osteoblástica en las pacientes con osteoporosis posmenopáusica, pero en este caso la observación realizada indica que el RANKL no parecería verse afectado a nivel de expresión génica al estimular el cultivo celular con vitamina D.

Los estrógenos juegan un papel muy importante en el mantenimiento de la masa ósea. El efecto más importante es la reducción de la resorción ósea de forma indirecta inhibiendo la osteoclastogénesis y de forma directa inhibiendo la función osteoclástica. En las mujeres posmenopáusicas, se produce un aumento del remodelado, debido a un aumento de la resorción que no es compensado por la formación con lo que da como resultado una pérdida ósea. El estrógeno es el factor más importante en la patogénesis de la osteoporosis posmenopáusica [Monroe D, 2003].

El 17β -estradiol estimulaba la expresión génica de OPG en una línea celular establecida procedente de osteoblastos humanos fetales con la transfección del receptor del estrógeno (hFOB/ER-9) y en cultivo primario de osteoblastos trabeculares humanos (hOB) [revisado en Hofbauer 1999].

Los resultados obtenidos en el presente estudio discrepan con los publicados en la literatura ya que al comparar los niveles de expresión génica de la OPG en los se observa una tendencia (no estadísticamente significativa) a la disminución de los niveles de expresión. De forma similar a las observaciones realizadas con la adición de vitamina D, se observa también una disminución de la expresión génica de la OPG en el grupo de pacientes con osteoporosis posmenopáusica indicativa del ya mencionado defecto osteoblástico.

Al realizar el análisis del efecto del 17β -estradiol sobre la expresión génica del RANKL no se ha encontrado ningún referente bibliográfico que explicara el efecto directo que tenía esta hormona sobre la expresión de este gen. Sin embargo los resultados del presente estudio no resultaron estadísticamente significativos y la tendencia general resultó ser un tanto contradictoria. Al comparar la expresión génica entre grupos no se observaron diferencias, pero al comparar los niveles de expresión génica con los niveles basales se observó una tendencia al aumento en el grupo de pacientes no osteoporóticas y una clara tendencia a la disminución en el caso del grupo de pacientes con osteoporosis posmenopáusica. Para explicar estos últimos resultados sería necesario un estudio más exhaustivo aumentando el número de

muestras analizadas y realizar determinaciones de la expresión génica de los diferentes receptores celulares estrogénicos ya que la evidente falta de poder estadístico justifica resultados erráticos o aún contradictorios.

2.3 EXPRESIÓN GÉNICA DEL POLIPÉPTIDO α 1 DEL COLÁGENO TIPO 1 Y LA OSTEOCALCINA

Los resultados obtenidos a partir de la determinación de los niveles relativos de expresión génica del polipéptido α 1 del colágeno tipo 1 y la osteocalcina en condiciones basales sin FCS en el medio mostraron una disminución de la expresión génica del COL1A1 y una tendencia casi significativa al aumento de la expresión génica de la osteocalcina el grupo de pacientes con osteoporosis posmenopáusica.

La disminución de la expresión génica del COL1A1 en las líneas primarias procedentes de pacientes con osteoporosis posmenopáusica daría como consecuencia una menor capacidad intrínseca de producir matriz de colágeno por parte de los osteoblastos osteoporóticos, que se correlacionaría con la manifestación clínica de la osteoporosis de disminución de la DMO y presencia de fracturas.

El caso de la osteocalcina, al ser una proteína relacionada con la mineralización de la matriz de colágeno debido a su capacidad de unión a la hidroxiapatita y a los iones de calcio, sin producirse modificaciones en su expresión génica, permitiría afirmar que no existe disfunción a nivel de la mineralización del osteoide.

El colágeno tipo 1 y la osteocalcina son expresados por los osteoblastos diferenciados [Mundy, 1995]. El colágeno tipo 1 y la fosfatasa alcalina se expresan pronto durante el compromiso hacia osteoblasto. En cambio la osteopontina y la osteocalcina se expresan en estadios más avanzados de la diferenciación [Rodan]. De esta manera, la tendencia al aumento de la expresión génica de la osteocalcina indicaría una posible modificación de los osteoblastos osteoporóticos, produciéndose una involución hacia una morfología osteocítica ya que en estos la osteocalcina se encuentra sobreexpresada y el colágeno disminuido.

2.4 EXPRESIÓN GÉNICA DEL Cbfa1 Y BMP-2

En el análisis de los resultados obtenidos en la determinación de los niveles de expresión génica del Cbfa1 y la *bone morphogenetic protein-2* (BMP-2) no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de estudio. Estos dos genes están implicados en la diferenciación de los osteoblastos en las primeras etapas de la osteoblastogénesis. El no producirse una disminución de la expresión de estos dos genes podría corroborar los resultados obtenidos en el apartado del análisis de la proliferación celular, donde no se encontraban tampoco diferencias estadísticamente significativas. Parece lógico pensar que si no se ve afectada la velocidad proliferación de los osteoblastos tampoco se vea afectada la expresión de los genes que intervienen en este proceso.

VII. Subestudio III

EFEECTO DE LA SIMVASTATINA Y LA ATORVASTATINA EN OSTEOLASTOS HUMANOS PRIMARIOS NORMALES Y LA LÍNEA CELULAR MG-63. ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO BMP-2 IMPLICADO EN LA OSTEOLASTOGÉNESIS, Y DEL COLÁGENO TIPO 1 Y LA OSTEOLALCINA IMPLICADOS EN LA SÍNTESIS DE LA MATRIZ ÓSEA.

HIPÓTESIS DE TRABAJO:

Las estatinas tienen un importante efecto sobre la fisiología del hueso induciendo a la actividad osteoblástica y a la formación ósea *in vitro* y *in vivo*.

El efecto de simvastatina y la atorvastatina sobre el metabolismo del hueso afecta a la proliferación de los osteoblastos y/o a la expresión de genes de diferenciación celular y reguladores del remodelado.

OBJETIVOS:

1. Determinar *in vitro* el efecto de distintas concentraciones de simvastatina y atorvastatina sobre la viabilidad osteoblástica en dos tipos celulares: osteoblastos humanos primarios y células MG-63.
2. Determinar *in vitro* el efecto de distintas concentraciones de simvastatina y atorvastatina en la proliferación osteoblástica en dos tipos celulares: osteoblastos humanos primarios y células MG-63.
3. Determinar *in vitro* el efecto de distintas concentraciones de simvastatina y atorvastatina sobre la expresión génica del polipéptido $\alpha 1$ del colágeno tipo 1 en dos tipos celulares: osteoblastos humanos primarios y células MG-63.
4. Determinar *in vitro* el efecto de distintas concentraciones de simvastatina y atorvastatina sobre la expresión génica de la osteocalcina, en dos tipos celulares: osteoblastos humanos primarios y células MG-63.
5. Determinar *in vitro* el efecto de distintas concentraciones de simvastatina y atorvastatina sobre la expresión génica de la BMP-2 en dos tipos celulares: osteoblastos humanos primarios y células MG-63.

1. RESULTADOS

1.1 SUJETOS DE ESTUDIO

1.1.1 Línea celular MG-63

Las MG-63 son una línea celular de osteosarcoma humano de un niño de 14 años adquiridas en la ATCC (*American Type Culture Colection*), referencia CRL-1427.

1.1.2 Osteoblastos primarios humanos normales

El “pool” de osteoblastos primarios se obtuvo de 3 muestras procedentes de intervenciones quirúrgicas de reemplazo por prótesis de cadera de dos mujeres y un hombre de entre 69 y 74 años, realizadas en el Hospital de Mar de Barcelona, con previo consentimiento informado del paciente.

1.2 TOXICIDAD DE LA SIMVASTATINA Y ATORVASTATINA SOBRE LOS OSTEOLASTOS PRIMARIOS HUMANOS NORMALES Y LAS MG-63

Para descartar el posible efecto tóxico de las estatinas analizadas sobre los osteoblastos a las diferentes concentraciones testadas se realizó un test de viabilidad celular utilizando un método de detección colorimétrica. Mediante un kit de ELISA (*Cell proliferation kit I (MTT)*) se determinó la capacidad que tenían las células vivas de romper el MTT en cristales púrpuras de formazan después de 24 horas de incubación con las diferentes concentraciones de las estatinas en los dos modelos osteoblásticos utilizados para el experimento.

Se utilizó un cultivo sin tratamiento como control positivo para determinar los porcentajes de viabilidad de los osteoblastos primarios y de las MG-63 en cultivo *in vitro* a las 24 horas con y sin la presencia de FCS en el medio. De esta forma se descartan procesos de muerte celular propios del sistema *in vitro* no relacionados con el efecto de las estatinas.

Al analizar los cultivos tratados con estatinas con y sin FCS en el medio, tanto en los osteoblastos primarios humanos normales, como en la línea celular MG-63 no se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar la proporción de células viables a las diferentes concentraciones de las dos estatinas con las células sin tratamiento utilizadas como control de viabilidad.

Los resultados obtenidos en cultivo *in vitro* de osteoblastos humanos permitieron afirmar que la simvastatina y la atorvastatina a las concentraciones de 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M y 10^{-6} M no producían un efecto tóxico sobre dichas células ya que no inducían un incremento de los procesos apoptóticos ni necróticos. Asimismo la presencia o ausencia de FCS en el medio de cultivo estimulado con estatinas no producía ningún sinergismo positivo o negativo sobre la viabilidad de los osteoblastos.

1.3 EFECTO DE LA SIMVASTATINA Y LA ATORVASTATINA SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN OSTEOLASTOS PRIMARIOS HUMANOS NORMALES Y EN CÉLULAS MG-63

Para estudiar el efecto *in vitro* de las estatinas sobre la proliferación celular de los osteoblastos humanos, concretamente de la simvastatina y la atorvastatina, se utilizó el ensayo de proliferación mediante la determinación de la incorporación de Brdu. De esta forma se pudo determinar la síntesis de DNA por las células presentes en cultivo que es un indicador preciso de la tasa de división celular. Mediante esta técnica no analizamos el modelo de crecimiento que siguen las células en sus diferentes fases de proliferación celular ya que partimos de la premisa de que en las líneas analizadas ya se ha comprobado que siguen una curva de crecimiento tipo para osteoblastos humanos, con una fase de latencia, una fase exponencial y una fase estacionaria, menos marcada esta última en el caso de la línea celular MG-63 ya que carece de inhibición por contacto. Por este motivo, en el análisis no se pretendía modelizar el crecimiento osteoblástico a través del tiempo sino ver la respuesta inmediata que tenían las células a un estímulo que en este caso era la incorporación de las estatinas a diferentes concentraciones dentro del medio de cultivo en el que se encontraban las células creciendo (incubación durante 24 horas). En todos los experimentos realizados se trabajó con los osteoblastos en fase de crecimiento exponencial ya que se trata de la etapa de crecimiento donde se puede analizar de forma más correcta la velocidad de división celular.

Se debe tener en cuenta que en este análisis no se detecta número de células, sino la actividad divisora que éstas tienen. De esta manera no se pudo detectar la apoptosis producida por un efecto tóxico de las estatinas en las células. La mayor aproximación que se pudo hacer fue en el caso de no obtener incorporación de DNA por parte de las células, y esto correspondería a un estado no proliferativo de las células existentes en las placas de cultivo o a una muerte por toxicidad de las mismas. Para evitar esta confusión, con anterioridad se realizó el ya explicado test de toxicidad para discernir entre estas dos posibilidades (ver apartado 2.1 de los resultados).

En todos los experimentos realizados se partía de un número controlado y fijo de células a partir del cual se empezó a medir el efecto que tenían las estatinas. Los valores siempre eran positivos, ya que medían incorporación.

Tabla 1: Proliferación celular en el “pool” de osteoblastos normales bajo tratamientos con distintas concentraciones de simvastatina y atorvastatina.

Tratamiento	M	Proliferación (Absorbancia 450nm)	
		Sin FCS	10% FCS
-----	-	0.298±0.019	0.812±0.106
Simvastatina	10 ⁻⁹	0.206±0.025*	0.553±0.123*
	10 ⁻⁸	0.219±0.044*	0.559±0.074*
	10 ⁻⁷	0.214±0.030*	0.479±0.102*
	10 ⁻⁶	0.215±0.022*	0.230±0.020*
Atorvastatina	10 ⁻⁹	0.243±0.054	0.778±0.108
	10 ⁻⁸	0.188±0.027*	0.698±0.148
	10 ⁻⁷	0.198±0.060*	0.549±0.182*
	10 ⁻⁶	0.183±0.027*	0.363±0.081*

Los resultados se expresan como absorbancia a 450nm (media ±DS)

p<0.05 prueba t para igualdad de medias (Test de t de Student)

Tabla 2: Proliferación celular en las MG-63 bajo tratamientos con distintas concentraciones de simvastatina y atorvastatina.

Tratamiento	M	Proliferación (Absorbancia 450nm)	
		Sin FCS	10% FCS
-----	-	1.207±0.139	1.428±0.042
Simvastatina	10 ⁻⁹	1.075±0.653	1.492±0.106
	10 ⁻⁸	1.121±0.327	1.258±0.110
	10 ⁻⁷	0.821±0.077*	1.420±0.111
	10 ⁻⁶	1.126±0.126	1.363±0.142
Atorvastatina	10 ⁻⁹	1.254±0.281	1.489±0.092
	10 ⁻⁸	1.068±0.109	1.535±0.093
	10 ⁻⁷	1.096±0.188	1.552±0.146
	10 ⁻⁶	1.022±0.051*	1.460±0.116

Los resultados se expresan como absorbancia a 450nm (media ±DS)

p<0.05 prueba t para igualdad de medias (Test de t de Student)

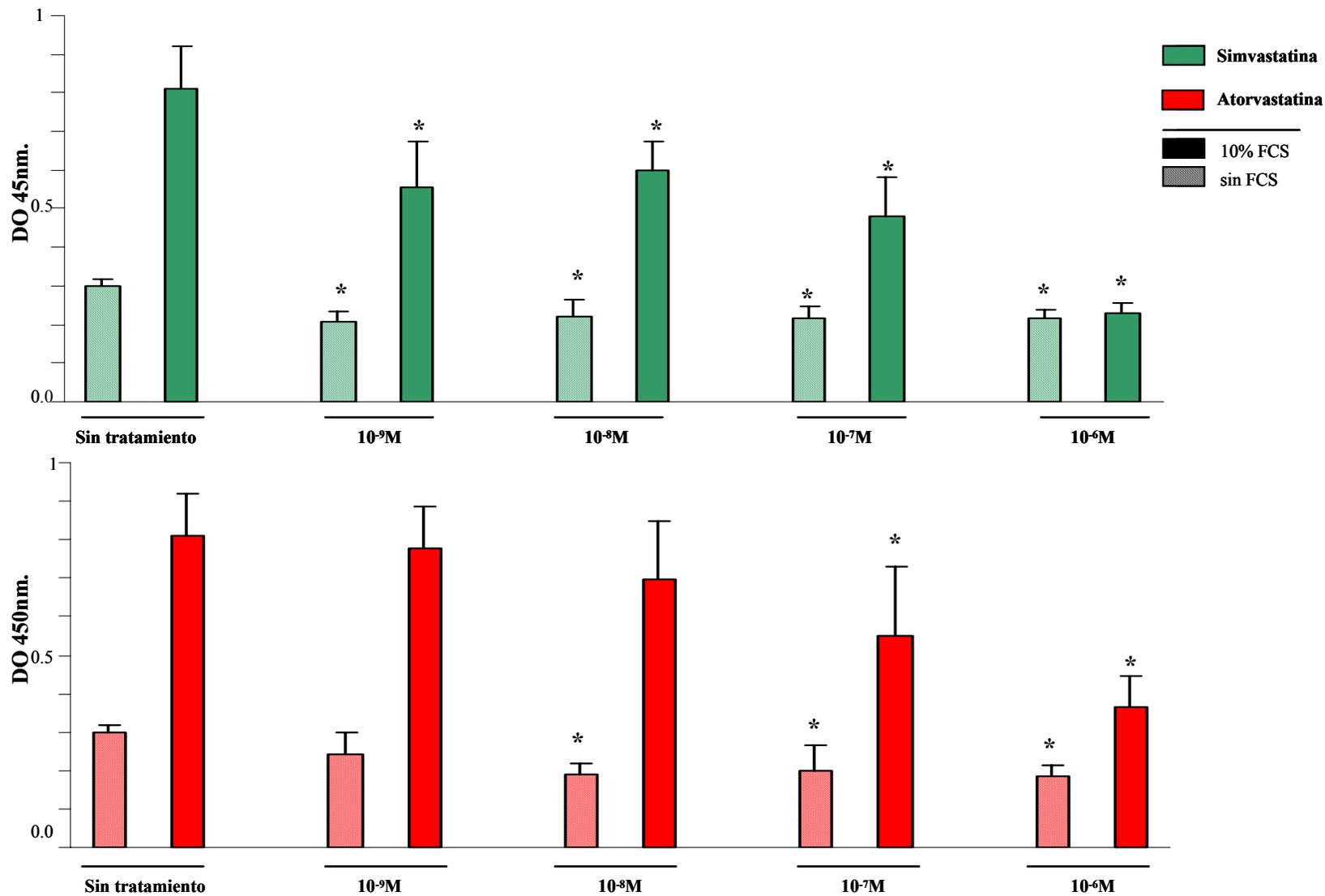


Figura 1: Proliferación celular del “pool” de células osteoblásticas primarias estimuladas con simvastatina/atorvastatina a las concentraciones de 10⁻⁹M, 10⁻⁸M, 10⁻⁷M y 10⁻⁶M medida mediante densidad óptica (DO) a 450nm. Los resultados se representan como media (±desviación estándar). Los símbolos indican diferencias significativas para cada concentración de estatina comparado con las mismas condiciones de cultivo sin tratamiento.

*p<0.005 prueba T para la igualdad de medias (Test de t Student)

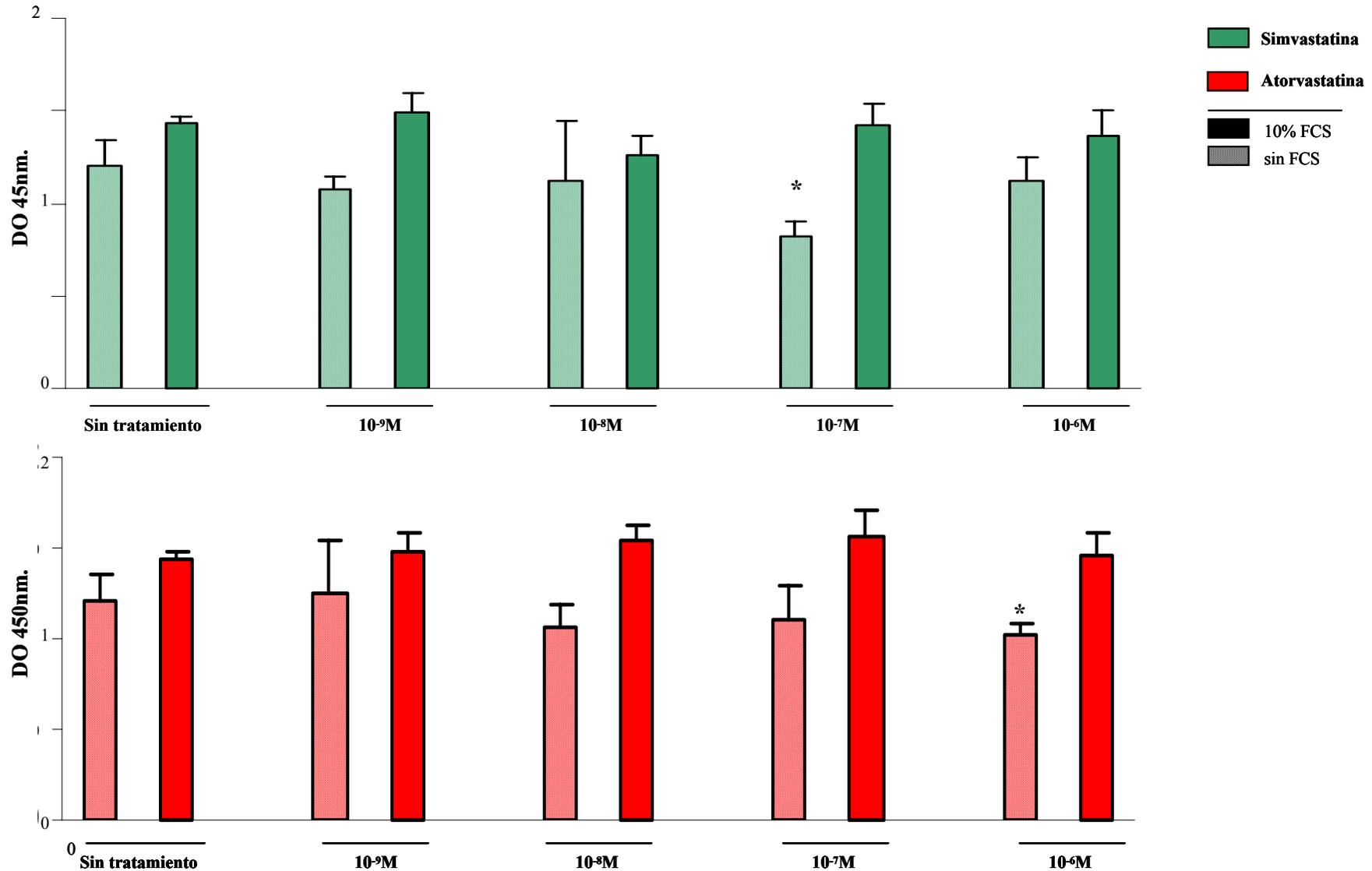


Figura 2: Proliferación celular de las MG-63 estimuladas con simvastatina/atorvastatina a las concentraciones de 10⁻⁹M, 10⁻⁸M, 10⁻⁷M y 10⁻⁶M medida mediante densidad óptica (DO) a 450nm. Los resultados se representan como media (±desviación estándar). Los símbolos indican diferencias significativas para cada concentración de estatina comparado con las mismas condiciones de cultivo sin tratamiento.

*p<0.005 prueba T para la igualdad de medias (Test de t Student).

Tal y como se observa en las figuras 1 y 2 se estudió el efecto de la simvastatina y la atorvastatina en un “pool” de osteoblastos primarios y en las células MG-63. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos y se incubaron 24 horas con las estatinas a las concentraciones de 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M y 10^{-6} M con y sin la presencia de FCS en el medio.

Cuando analizamos el efecto de la adición de las dos estatinas en los cultivos (simvastatina y atorvastatina) a las diferentes concentraciones en los osteoblastos primarios humanos normales se observó una disminución de la proliferación celular concentración-dependiente. En el caso de la simvastatina se observó un efecto más importante que en el caso de la atorvastatina ya que la disminución de la proliferación celular fue estadísticamente significativa a partir de la concentración de 10^{-9} M en todas las concentraciones testadas tanto si se había añadido FCS en el medio ($p=0.019$, $p=0.017$, $p=0.004$, $p=0.000$, respectivamente, Test de t Student), como cuando se realizó en condiciones basales sin la incorporación de FCS en el medio de cultivo ($p=0.001$, $p=0.017$, $p=0.004$, $p=0.001$, respectivamente, Test de t Student). En cambio, en el caso de la atorvastatina el efecto se observó a partir de la concentración de 10^{-8} M cuando no se había añadido FCS en el medio ($p=0.001$, $p=0.029$, $p=0.001$, respectivamente, Test de t Student) y a partir de la concentración de 10^{-7} M cuando se había añadido en el medio ($p=0.047$, $p=0.001$, respectivamente, Test de t Student).

En las dos estatinas se observó que al añadir FCS en el medio se producía una tendencia progresiva a la disminución de la proliferación celular al aumentar la concentración del fármaco. Por el contrario al no añadir FCS al medio, el efecto dosis-dependiente parecía no ser tan importante distinguiéndose un efecto claro del tratamiento pero sin una relación con la concentración de las estatinas (Figura 1).

Cuando analizamos el efecto de la incorporación de las dos estatinas en el medio (simvastatina y atorvastatina) a las diferentes concentraciones, en las células MG-63 solamente se observó una disminución de la proliferación celular a la concentración de 10^{-7} M ($p=0.003$, Test de t Student) sin presencia de FCS en el medio en el caso de la simvastatina y a la concentración de 10^{-6} M ($p=0.048$, Test de t Student) sin FCS en el caso de la atorvastatina (Figura 2).

1.4 EFECTO DE LA SIMVASTATINA Y LA ATORVASTATINA SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DEL POLIPÉPTIDO $\alpha 1$ DEL COLÁGENO TIPO 1 (COL1A1) EN OSTEÓBLASTOS PRIMARIOS HUMANOS NORMALES Y LAS CÉLULAS MG-63

El análisis del efecto de la simvastatina y la atorvastatina a diferentes concentraciones en los osteoblastos primarios humanos normales y células MG-63 durante 24 horas de incubación sobre la expresión génica del COL1A1 se realizó mediante *real time* PCR con los cDNA obtenidos por la retrotranscripción del RNA extraído de los cultivos celulares estimulados con las estatinas.

Con anterioridad a la cuantificación de los niveles de expresión génica de COL1A1 se determinó cualitativamente si los osteoblastos primarios normales y las MG-63 expresaban COL1A1 bajo la estimulación con las estatinas. A las concentraciones más elevadas de simvastatina y atorvastatina se detectó expresión génica con lo que se puede afirmar que las estatinas no inhiben dicha expresión génica del COL1A1 por parte de los osteoblastos (Figura 3).

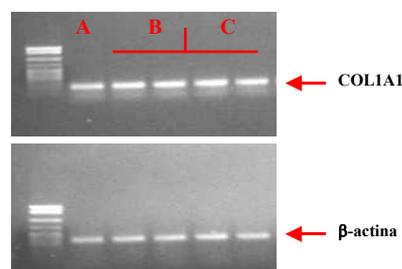


Figura 3: Análisis por PCR de los transcritos del COL1A1. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR amplificados usando las condiciones de PCR de la PCR a tiempo real y las sondas TaqMan. Se utilizó la β -actina como control endógeno de la reacción. **A:** Basal. **B:** 10^{-6} M simvastatina/atorvastatina en osteoblastos primarios normales. **C:** 10^{-6} M simvastatina/atorvastatina en las MG-63

En los resultados obtenidos en los osteoblastos primarios humanos normales no se observa efecto del tratamiento con las estatinas a las concentraciones analizadas cuando no se añadió FSC en el medio de cultivo. Contrariamente, en los cultivos donde se añadió FCS en el medio se observó un comportamiento concentración-dependiente en las dos estatinas analizadas. En el caso de la simvastatina se producía un aumento estadísticamente significativo, que era progresivo al aumentar la concentración de la estatina de 10^{-9} M a 10^{-6} M ($p=0.037$, $p=0.002$, $p=0.014$, $p=0.009$, respectivamente, Test de t Student). En el caso de la atorvastatina se obtuvo también un aumento significativo de la expresión génica del COL1A1 dosis dependiente al compararlo con el control, pero en este caso con un pico de expresión máxima a la concentración de 10^{-7} M. En este último caso el efecto estimulador de la expresión génica se manifestó a dosis más altas, siendo la primera a 10^{-8} M hasta 10^{-6} M ($p=0.020$, $p=0.003$ y $p=0.012$ respectivamente, Test de t Student) (Figura 4)(Tabla 3).

En los resultados obtenidos con las células MG-63 no se observó efecto del tratamiento con las estatinas utilizadas cuando no se añadió FCS en el medio de cultivo a excepción de la concentración de 10^{-9} M en el

caso de la simvastatina y de 10^{-7} M en el caso de la atorvastatina donde se observó un aumento estadísticamente significativo de los niveles de expresión génica de COL1A1. En los cultivos donde se añadió FCS en el medio observamos un comportamiento concentración dependiente solamente en una de las estatinas analizadas. En el caso de la simvastatina se produjo un aumento de la expresión génica del COL1A1 estadísticamente significativo a todas las concentraciones de las estatinas ($p=0.025$, $p=0.011$, $p=0.049$, $p=0.041$, respectivamente, Test de t Student) y en el caso de la atorvastatina no se observó efecto de las estatinas sobre la expresión génica del COL1A1 (Figura 5)(Tabla 4).

Tabla 3: Expresión relativa del COL1A1 en el “pool” de osteoblastos primarios normales bajo el tratamiento de diferentes concentraciones de simvastatina y atorvastatina. COL1A1-actina

Tratamiento	M	COL1A1	
		Sin FCS	10% FCS
-----	-	257.8±3.9	74.4±2.6
Simvastatina	10^{-9}	244±22.2	161.7±7.7*
	10^{-8}	289±7.3	177.6±3.1*
	10^{-7}	163.4±18.1	212.9±6.6*
	10^{-6}	279.2±2.38	215.9±5.7*
Atorvastatina	10^{-9}	327.2±2.2	55.8±2.9
	10^{-8}	207±2.8	160.3±5.0*
	10^{-7}	267.5±1.7	451.1±14.9*
	10^{-6}	252±5.1	212.8±5.37*

(media ±DS) $p<0.05$ prueba t para igualdad de medias (Test de t de Student)

Tabla 4: Expresión relativa del COL1A1 en las MG-63 bajo el tratamiento de diferentes concentraciones de simvastatina y atorvastatina. COL1A1-actina

tratamiento	M	COL1A1	
		Sin FCS	10% FCS
-----	-	29.52±0.70	8.27±0.02
Simvastatina	10^{-9}	43.19±0.42*	32.25±0.66*
	10^{-8}	31.83±0.36	16.06±0.58*
	10^{-7}	23.63±0.36	16.89±0.83*
	10^{-6}	29.17±0.48	17.10±0.40*
Atorvastatina	10^{-9}	9.99±0.13*	12.07±0.72
	10^{-8}	27.41±0.76	9.07±0.12
	10^{-7}	47.43±1.01*	5.83±1.34
	10^{-6}	22.10±4.00	1.53±1.09

(media ±DS) $p<0.05$ prueba t para igualdad de medias (Test de t de Student)

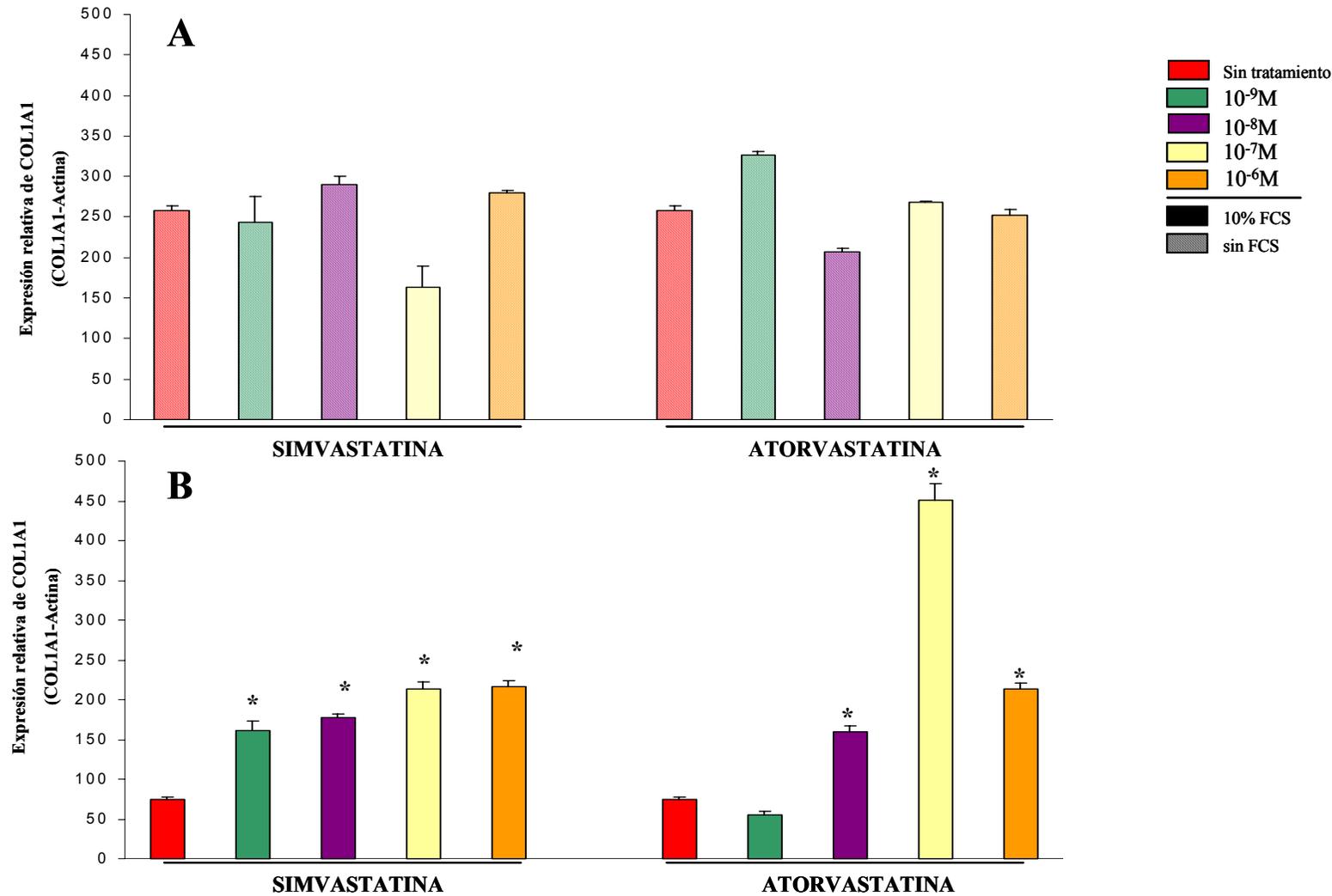


Figura 3: Análisis por PCR a tiempo real de los transcritos del polipéptido $\alpha 1$ del colágeno tipo 1 (COL1A1) bajo tratamiento con simvastatina y atorvastatina. Se representan las medias (\pm error estándar) de la expresión relativa de COL1A1 (COL1A1-actina) correspondientes al “pool” de osteoblastos primarios humanos. A: Representa los diferentes tratamientos sin FCS en el medio. B: Representa los diferentes tratamientos con 10% de FCS en el medio. Los símbolos indican diferencias significativas para cada concentración de estatina comparado con las mismas condiciones de cultivo sin tratamiento.

* $p < 0.05$ prueba T para la igualdad de medias (Test de t Student)

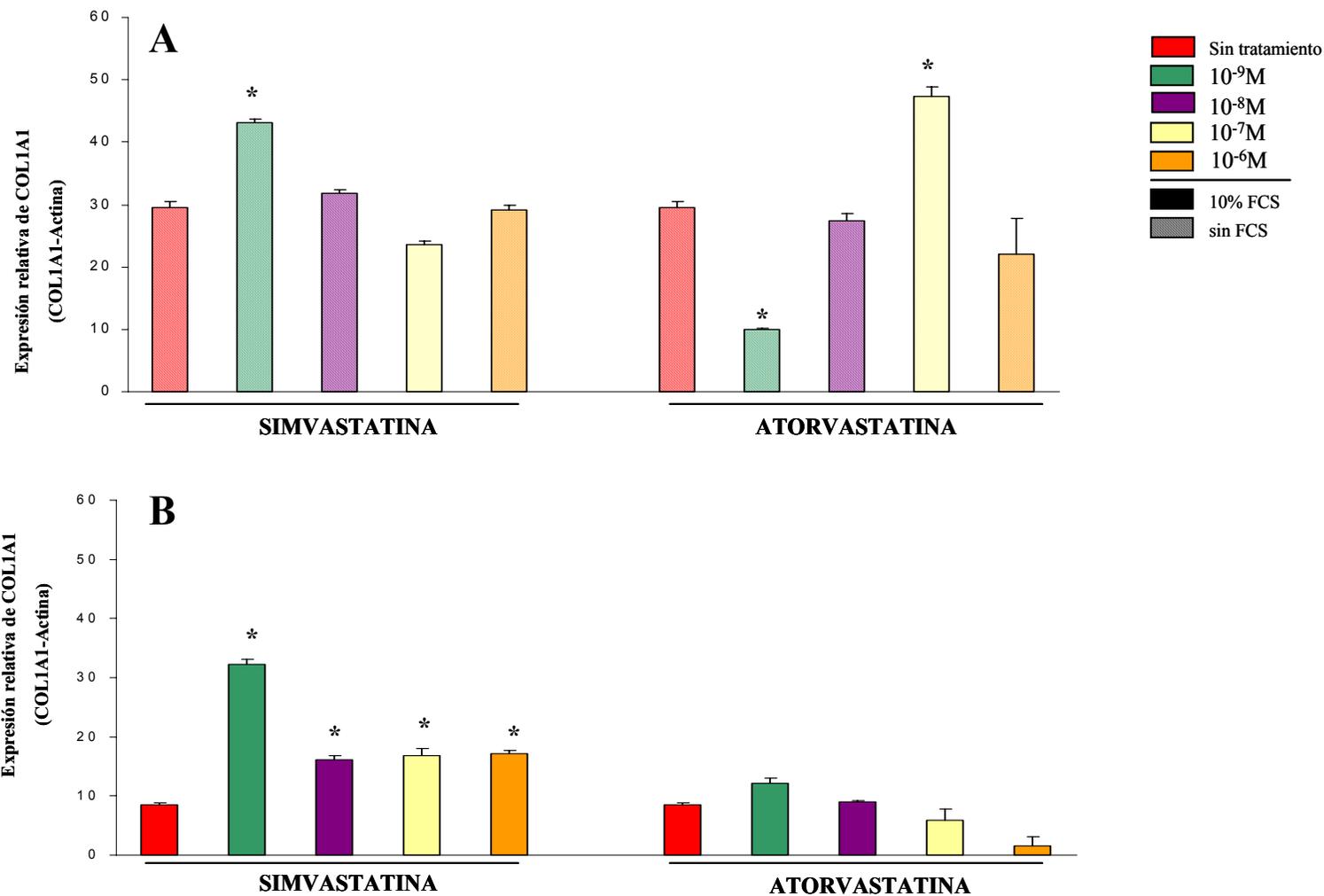


Figura 4: Análisis por PCR a tiempo real de los transcritos del polipéptido $\alpha 1$ del colágeno tipo 1 (COL1A1) bajo tratamiento con simvastatina y atorvastatina. Se representan las medias (\pm error estándar) de la expresión relativa de COL1A1(COL1A1-actina) correspondientes a las células MG-63. A: Representa los diferentes tratamientos sin FCS en el medio. B: Representa los diferentes tratamientos con 10% de FCS en el medio. Los símbolos indican diferencias significativas para cada concentración de estatina comparado con las mismas condiciones de cultivo sin tratamiento.

1.5 EFECTO DE LA SIMVASTATINA Y LA ATORVASTATINA SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LA OSTEOCALCINA EN OSTEÓBLASTOS PRIMARIOS HUMANOS NORMALES Y EN CÉLULAS MG-63

El análisis del efecto de la simvastatina y la atorvastatina a diferentes concentraciones en los osteoblastos primarios humanos normales y las células MG-63 durante 24 horas de incubación sobre la expresión génica de la osteocalcina se realizó mediante *real time* PCR con los cDNA obtenidos por la retrotranscripción del RNA extraído de los cultivos celulares estimulados con las estatinas.

Con anterioridad a la cuantificación de los niveles de expresión génica de osteocalcina se determinó cualitativamente si los osteoblastos primarios normales y las MG-63 expresaban osteocalcina bajo la estimulación con las estatinas. A las concentraciones más elevadas de simvastatina y atorvastatina se detectó expresión génica con lo que se puede afirmar que las estatinas no inhiben la expresión génica del osteocalcina por parte de los osteoblastos (Figura 6).

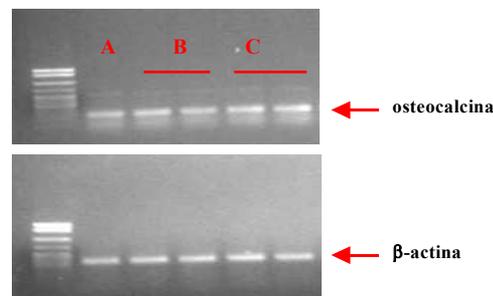


Figura 6: Análisis por PCR de los transcritos de la osteocalcina. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR amplificados usando las condiciones de PCR de la PCR a tiempo real y las sondas TaqMan. Se utilizó la β -actina como control endógeno de la reacción. **A:** Basal. **B:** 10^{-6} M simvastatina/atorvastatina en osteoblastos primarios normales. **C:** 10^{-6} M simvastatina/atorvastatina en las células MG-63

Al analizar el efecto de la simvastatina y la atorvastatina sobre los osteoblastos primarios humanos normales se observó un aumento significativo de la expresión génica de la osteocalcina en ambos casos, con o sin la adición de FCS, a las concentraciones más elevadas. En el caso de la simvastatina se obtuvieron valores estadísticamente significativos con las concentraciones de 10^{-7} M y 10^{-6} M ($p=0.03$ y $p=0.016$, respectivamente, Test de t Student) sin FCS en el medio y ($p=0.01$ y $p=0.022$, respectivamente, Test de t Student) y con 10% de FCS en el medio. En el caso de la atorvastatina se observaron diferencias estadísticamente significativas a la concentración de 10^{-6} M con y sin la presencia de FCS en el medio ($p=0.008$ y $p=0.032$ respectivamente, Test de t Student) (Figura 7)(Tabla 5).

Al analizar el efecto de la simvastatina y la atorvastatina sobre las células MG-63 se observó un aumento significativo de la expresión génica de la osteocalcina en ambas estatinas, con o sin la adición de FCS en el medio, a las concentraciones más elevadas. En el caso de la simvastatina se obtuvieron valores estadísticamente superiores con las concentraciones de 10^{-8} M, 10^{-7} M y 10^{-6} M ($p=0.017$, $p=0.030$ y $p=0.00$

respectivamente, Test de t Student) sin FCS en el medio. En el caso de la atorvastatina se observó un aumento estadísticamente significativo a la concentración de 10^{-6} M con la presencia de FCS en el medio ($p=0.001$, Test de t Student) y en todas las concentraciones sin presencia de FCS en el medio ($p=0.038$, $p=0.002$, $p=0.003$ y $p=0.003$ respectivamente, Test de t Student)(Figura 8)(Tabla 6).

Tabla 5: Expresión relativa de la osteocalcina en el “pool” de osteoblastos primarios normales bajo el tratamiento de diferentes concentraciones de simvastatina y atorvastatina. Osteocalcina-actina

tratamiento	M	Osteocalcina	
		Sin FCS	10% FCS
-----	-	1.04±0.09	0.413±0.05
Simvastatina	10^{-9}	0.84±0.06	0.6±0.08
	10^{-8}	1.12±0.12	0.519±0.02
	10^{-7}	7.61±0.4*	2.27±0.09*
	10^{-6}	4.14±0.19*	1.19±0.08*
Atorvastatina	10^{-9}	0.708±0.07	0.48±0.01
	10^{-8}	1.25±0.07	0.533±0.03
	10^{-7}	1.53±0.11	0.44±0.04
	10^{-6}	5.11±0.15*	1.19±0.08*

(media ±DS) $p<0.05$ prueba t para igualdad de medias (Test de t de Student)

Tabla 6: Expresión relativa de la osteocalcina en las MG-63 bajo el tratamiento de diferentes concentraciones de simvastatina y atorvastatina. Osteocalcina-actina

tratamiento	M	Osteocalcina	
		Sin FCS	10% FCS
-----	-	2.06±0.07	1.16±0.09
Simvastatina	10^{-9}	3.40±0.18	0.72±0.4
	10^{-8}	2.88±0.04	1.24±0.11
	10^{-7}	4.15±0.17	0.5±0.08
	10^{-6}	10.02±0.08	1.32±0.14
Atorvastatina	10^{-9}	3.41±0.15*	1.17±0.07
	10^{-8}	4.61±0.07*	0.82±0.04
	10^{-7}	3.84±0.07*	1.08±0.03
	10^{-6}	18.71±0.32*	4.72±0.15*

(media ±DS) $p<0.05$ prueba t para igualdad de medias (Test de t de Student)

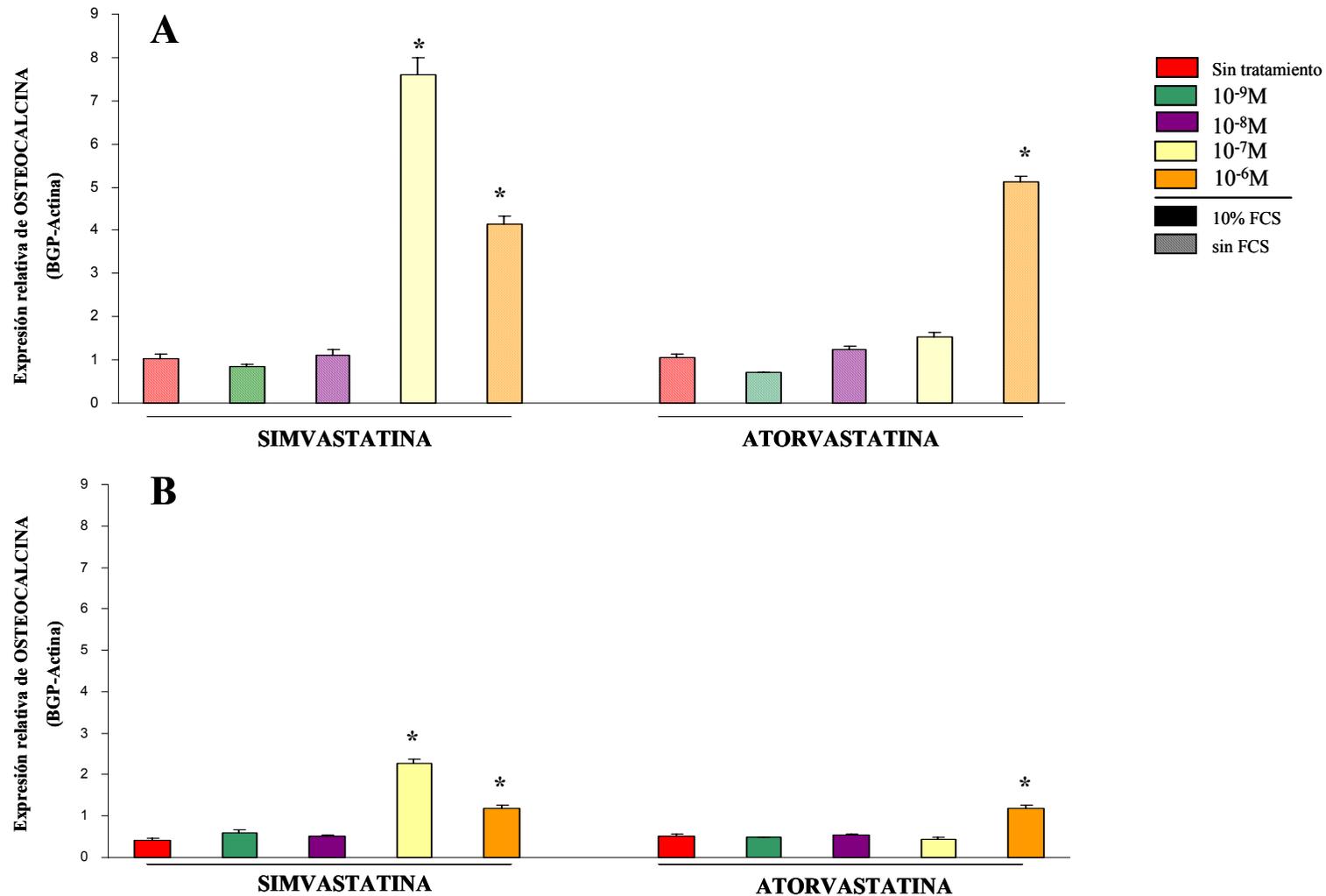


Figura 5: Análisis por PCR a tiempo real de los transcritos de osteocalcina (BGP) bajo tratamiento con simvastatina y atorvastatina. Se representan las medias (\pm error estándar) de la expresión relativa de osteocalcina (BGP-actina) correspondientes al “pool” de osteoblastos primarios humanos. A: Representa los diferentes tratamientos sin FCS en el medio. B: Representa los diferentes tratamientos con 10% de FCS en el medio. Los símbolos indican diferencias significativas para cada concentración de estatina comparado con las mismas condiciones de cultivo sin tratamiento.

* $p < 0.05$ prueba T para la igualdad de medias (Test de t Student)

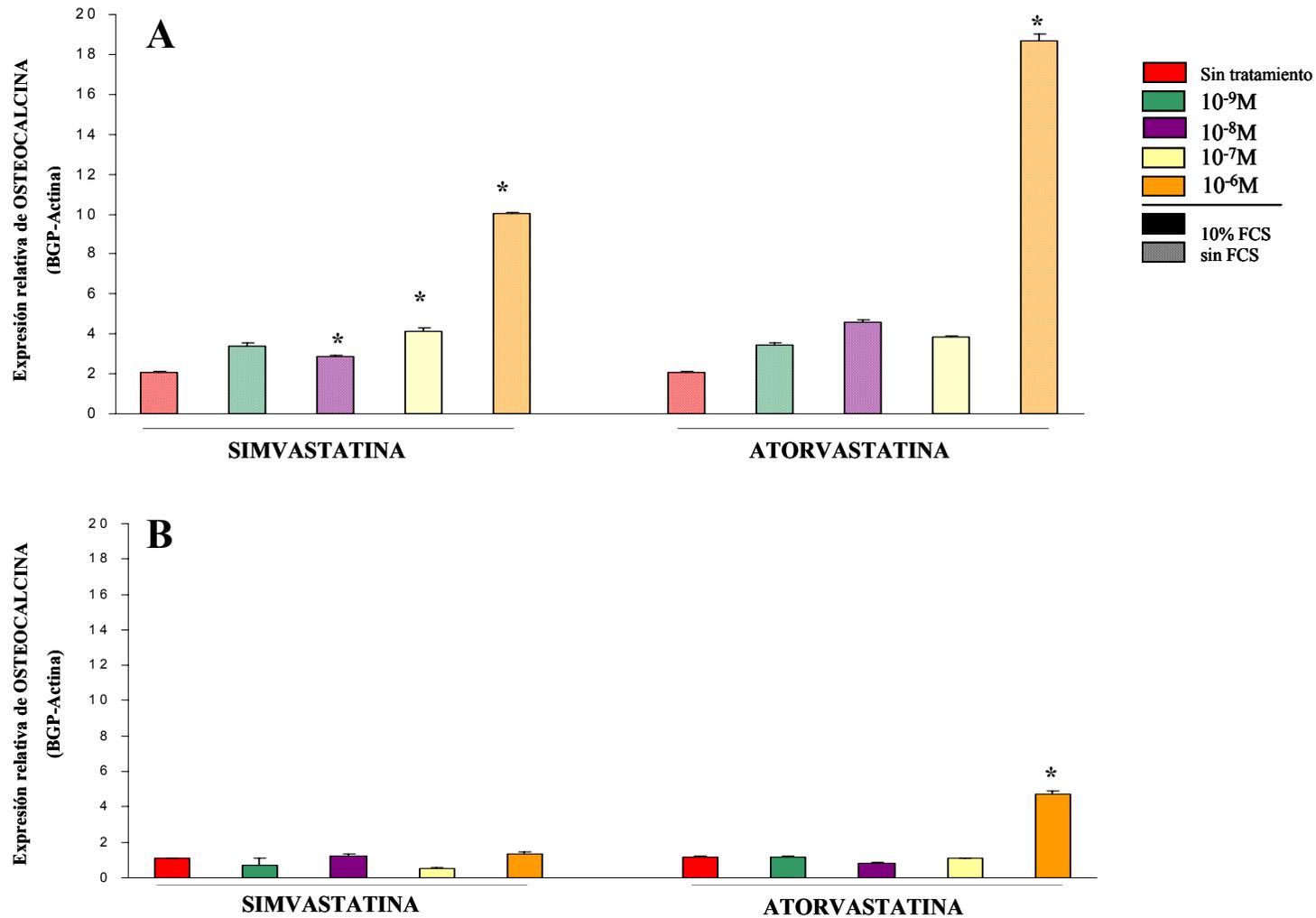


Figura 6: Análisis por PCR a tiempo real de los transcritos de osteocalcina (BGP) bajo tratamiento con simvastatina y atorvastatina. Se representan las medias (\pm error estándar) de la expresión relativa de BGP(BGP-actina) correspondientes a las células MG-63. A: Representa los diferentes tratamientos sin FCS en el medio. B: Representa los diferentes tratamientos con 10% de FCS en el medio. Los símbolos indican diferencias significativas para cada concentración de estatina comparado con las mismas condiciones de cultivo sin tratamiento.

1.6 EFECTO DE LA SIMVASTATINA Y LA ATORVASTATINA SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LA *BONE MORPHOGENETIC PROTEIN-2* (BMP-2) EN OSTEÓBLASTOS PRIMARIOS HUMANOS NORMALES Y EN CÉLULAS MG-63

El análisis del efecto de la simvastatina y la atorvastatina a diferentes concentraciones en los osteoblastos primarios humanos normales y las células MG-63 durante 24 horas de incubación sobre la expresión génica de la BMP-2 se realizó mediante *real time* PCR con los cDNA obtenidos por la retrotranscripción del RNA extraído de los cultivos celulares estimulados con las estatinas.

Con anterioridad a la cuantificación de los niveles de expresión génica de la BMP-2 se determinó cualitativamente si los osteoblastos primarios normales y las MG-63 expresaban BMP-2 bajo la estimulación con las estatinas. A las concentraciones más elevadas de simvastatina y atorvastatina se detectó expresión génica con lo que se puede afirmar que las estatinas no inhiben la expresión génica del BMP-2 por parte de los osteoblastos (Figura 9).

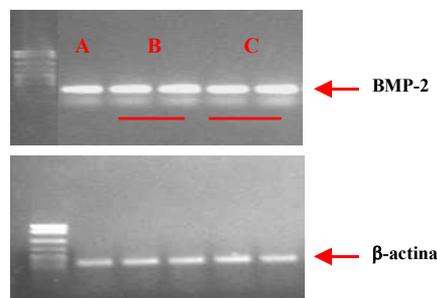


Figura 9: Análisis por PCR de los transcritos de la BMP-2. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR amplificados usando las condiciones de PCR de la PCR a tiempo real y las sondas TaqMan. Se utilizó la β -actina como control endógeno de la reacción. **A:** Basal. **B:** 10^{-6} M simvastatina/atorvastatina en osteoblastos primarios normales. **C:** 10^{-6} M simvastatina/atorvastatina en células MG-63

Al analizar el efecto de la simvastatina y atorvastatina sobre la expresión génica de la *bone morphogenetic protein-2* se observó que estas tenían un claro efecto estimulador que se comportaba de manera dosis-dependiente en líneas generales, de forma que al aumentar la concentración de las estatinas presentes en el medio la expresión génica de la BMP-2 aumentaba.

En los osteoblastos primarios humanos normales la tendencia general al aumento de la expresión génica de BMP-2 no fue estadísticamente significativa en ninguna de las estatinas analizadas en ausencia de FCS en el medio. Asimismo al añadir FCS en el medio el aumento de la expresión génica resultó ser significativo a la concentración de 10^{-7} M en el caso de la simvastatina ($p=0.032$, Test de t Student) y a la concentración de 10^{-6} M en el caso de la atorvastatina ($p=0.016$, Test de t Student)(Figura 10)(Tabla 7).

En las células MG-63 la tendencia general de comportamiento tuvo un efecto más potente en el caso de la simvastatina donde se observó un pico de expresión máxima con la concentración de 10^{-7} M, siendo el

nivel de expresión génica, a esta concentración, estadísticamente superior al control sin tratamiento tanto en el cultivo sin FCS en el medio ($p=0.004$, Test de t Student) como en presencia del 10% de FCS en el medio ($p=0.009$, Test de t Student). Asimismo en el caso de la atorvastatina se observó el pico de nivel de expresión génica máxima a una concentración de $10^{-6}M$, siendo en este caso estadísticamente superior al control sin tratamiento tanto en el cultivo sin FCS ($p=0.046$, Test de t Student) como con el 10% de FCS ($p=0.030$, Test de t Student)(Figura 11)(Tabla 8).

Tabla 7: Expresión relativa de la BMP-2 en el “pool” de osteoblastos primarios normales bajo el tratamiento de diferentes concentraciones de simvastatina y atorvastatina. BMP-2-actina

Tratamiento	M	BMP-2	
		Sin FCS	10% FCS
-----	-	1.64±0.22	0.67±0.17
Simvastatina	10^{-9}	1.11±0.10	0.6±0.22
	10^{-8}	1.23±0.21	0.91±0.01
	10^{-7}	1.16±0.12	3.05±0.05*
	10^{-6}	2.29±0.08	1.12±0.1
Atorvastatina	10^{-9}	0.91±0.14	0.3±0.1
	10^{-8}	1.44±0.11	0.46±0.03
	10^{-7}	1.47±0.08	1.16±0.1
	10^{-6}	1.41±0.41	2.51±0.15*

(media ±DS) $p<0.05$ prueba t para igualdad de medias (Test de t de Student)

Tabla 8: Expresión relativa de la BMP-2 en las MG-63 bajo el tratamiento de diferentes concentraciones de simvastatina y atorvastatina. BMP-2-actina

Tratamiento	M	COL1A1	
		Sin FCS	10% FCS
-----	-	0.87±0.1	0.8±0.11
Simvastatina	10^{-9}	0.74±0.05	0.82±0.08
	10^{-8}	0.94±0.14	1.21±0.12
	10^{-7}	3.07±0.08*	2.64±0.07*
	10^{-6}	2.29±0.46	1.68±0.2
Atorvastatina	10^{-9}	0.44±0.09	0.87±0.07
	10^{-8}	1.11±0.11	0.75±0.18
	10^{-7}	1.06±0.04	0.64±0.01
	10^{-6}	1.37±0.04*	2.78±0.21*

(media ±DS) $p<0.05$ prueba t para igualdad de medias (Test de t de Student)

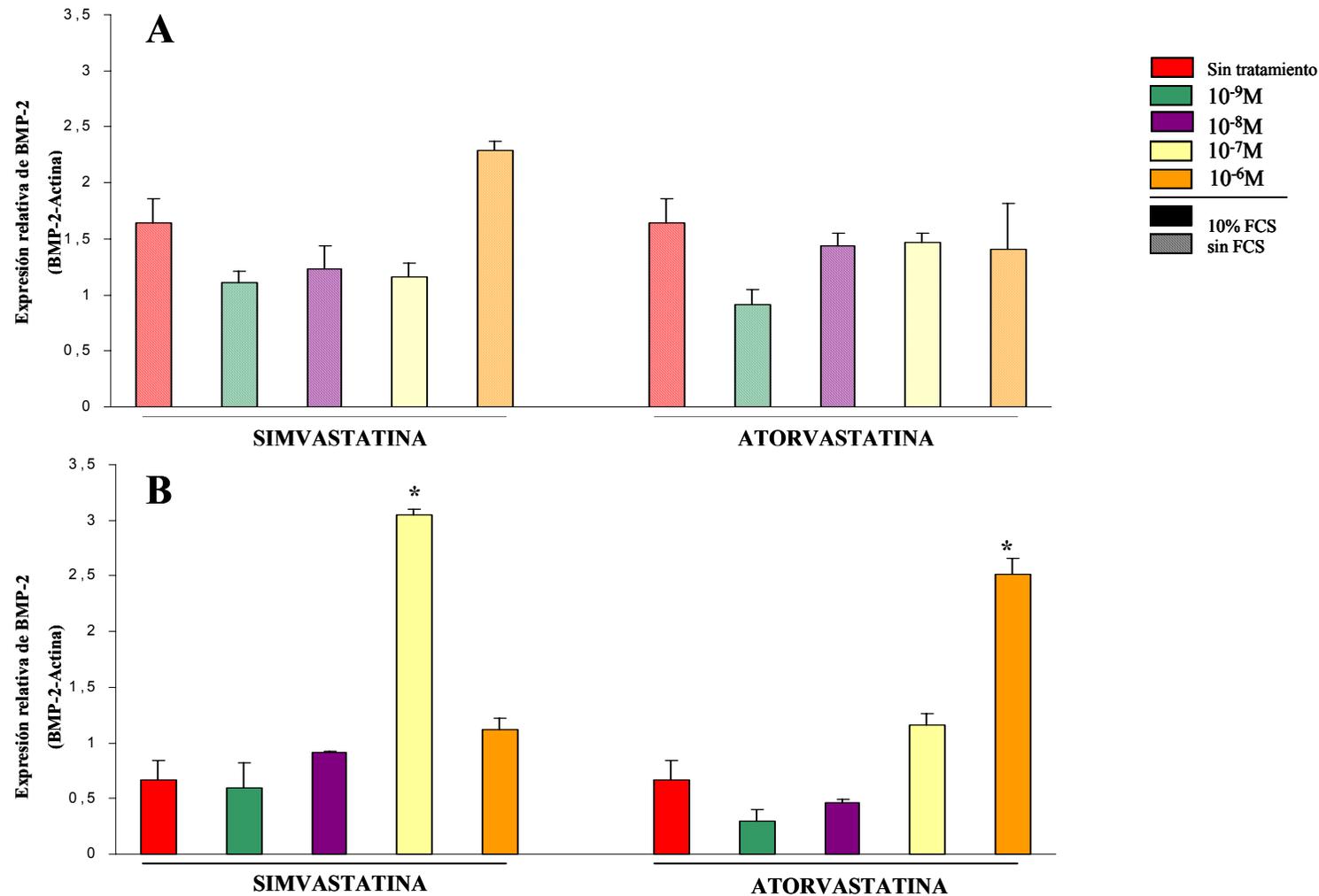


Figura 7: Análisis por PCR a tiempo real de los transcritos de *bone morphogenetic protein-2* (BMP-2) bajo tratamiento con simvastatina y atorvastatina. Se representan las medias (\pm error estándar) de la expresión relativa de osteocalcina (BGP-actina) correspondientes al “pool” de osteoblastos primarios humanos. A: Representa los diferentes tratamientos sin FCS en el medio. B: Representa los diferentes tratamientos con 10% de FCS en el medio. Los símbolos indican diferencias significativas para cada concentración de estatina comparado con las mismas condiciones de cultivo sin tratamiento.

* $p < 0.05$ prueba T para la igualdad de medias (Test de t Student)

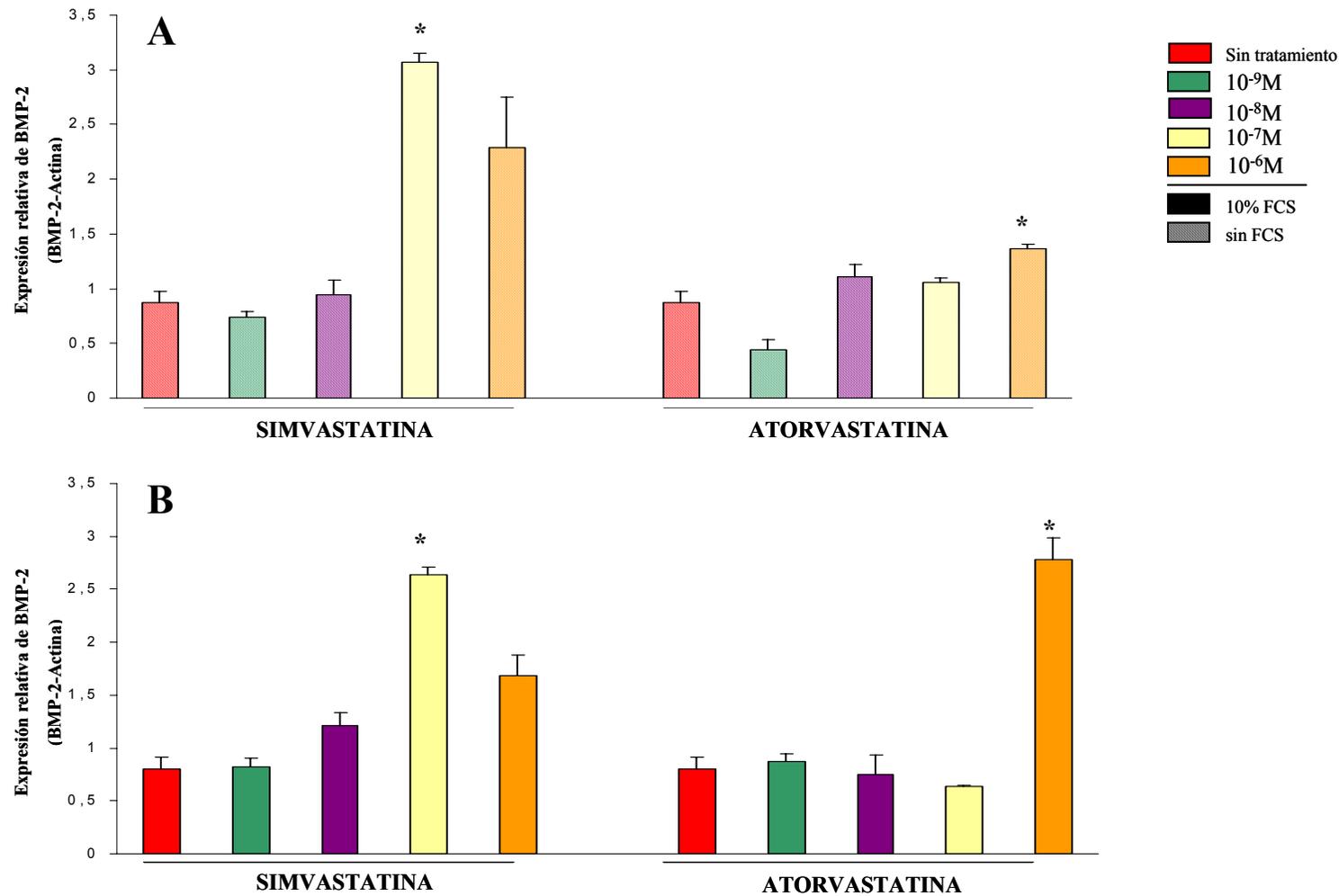


Figura 8: Análisis por PCR a tiempo real de los transcritos de *bone morphogenetic protein-2* (BMP-2) bajo tratamiento con simvastatina y atorvastatina. Se representan las medias (\pm error estándar) de la expresión relativa de osteocalcina (BGP-actina) correspondientes a las células MG-63. A: Representa los diferentes tratamientos sin FCS en el medio. B: Representa los diferentes tratamientos con 10% de FCS en el medio. Los símbolos indican diferencias significativas para cada concentración de estatina comparado con las mismas condiciones de cultivo sin tratamiento.

* $p < 0.05$ prueba T para la igualdad de medias (Test de t Student)

1.7 EFECTO DE LA SIMVASTATINA Y LA ATORVASTATINA SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR A LO LARGO DEL TIEMPO EN OSTEOLASTOS PRIMARIOS HUMANOS NORMALES Y EN CÉLULAS MG-63

En este experimento se pretendía corroborar si el efecto de las estatinas sobre la proliferación celular era dependiente del tiempo de incubación, es decir, si existía un comportamiento variable sobre la inhibición de la proliferación al aumentar el tiempo de incubación de las estatinas con los osteoblastos.

Para la realización de los experimentos se utilizaron las mismas condiciones experimentales que las utilizadas en el análisis del efecto de las estatinas sobre la proliferación celular a la 24 horas de incubación y se ampliaron los tiempos de incubación de las estatinas con las células. De esta manera en cada concentración testada de las dos estatinas se analizó la proliferación celular, con y sin la presencia de FCS en el medio, a las 24, 48, 72 y 96 horas de incubación.

Al realizar una valoración global de los resultados obtenidos se observó que la tendencia a la disminución de la proliferación celular ya observada a las 24 horas de incubación de las células con las estatinas se hacía más evidente con el tiempo. El control basal de la proliferación nos indicaba en todos los casos que de forma progresiva se producía un aumento de la incorporación de DNA correspondiente a un aumento del número de células. Al añadir las estatinas, a medida que la concentración de estas aumentaba se observó menor efecto del aumento de la estimulación con la prolongación del tiempo de incubación. De esta manera se pudo afirmar que el efecto de la simvastatina y la atorvastatina sobre los osteoblastos en cultivo *in vitro* era tiempo-dependiente y tendía a aumentar con mayores exposiciones de las células al fármaco (Figura 12 y 13).

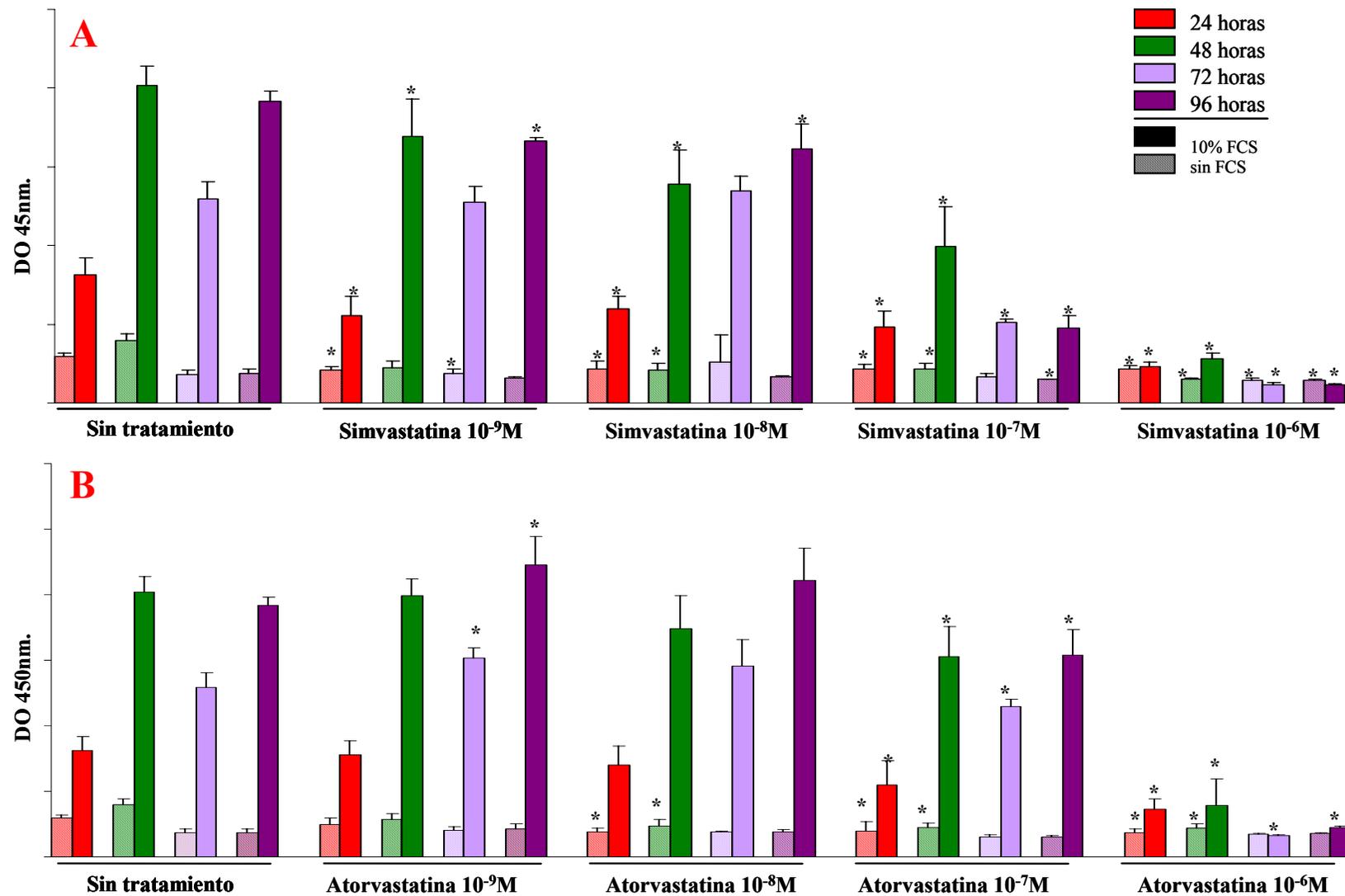


Figura 9: Representación gráfica de la proliferación celular del “pool” de células osteoblásticas primarias estimuladas con simvastatina/atorvastatina a las concentraciones de 10⁻⁹M, 10⁻⁸M, 10⁻⁷M y 10⁻⁶M medida mediante densidad óptica (DO) a 450nm. Los resultados se representan como media (±desviación estándar).A: simvastatina. B: atorvastatina. Los símbolos indican diferencias significativas para cada concentración de estatina comparado con las mismas condiciones de cultivo sin tratamiento.

*p<0.05 prueba T para la igualdad de medias (Test de t de Student)

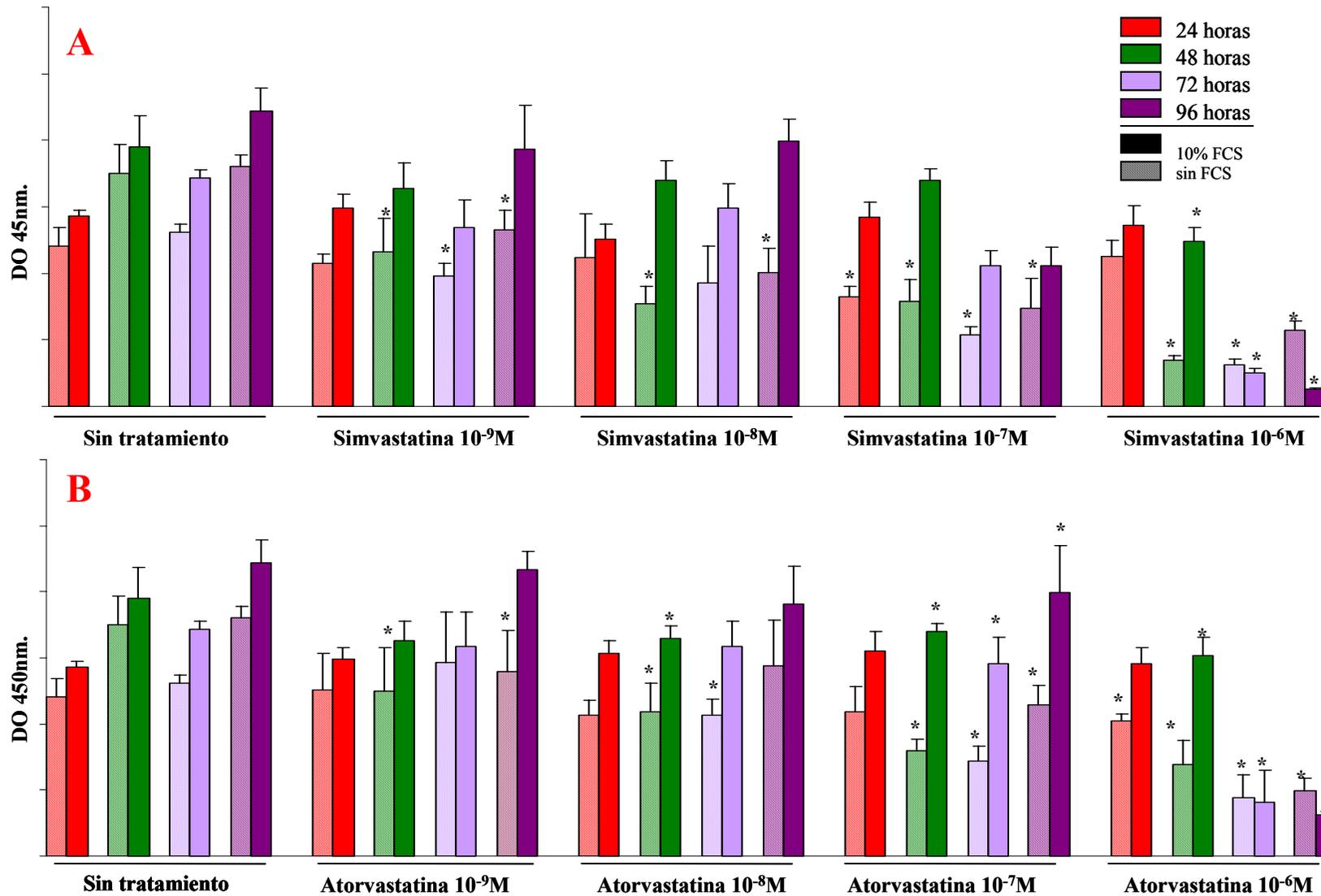


Figura 10: Representación gráfica de la proliferación celular de las MG-63 estimuladas con simvastatina/atorvastatina a las concentraciones de 10⁻⁹M, 10⁻⁸M, 10⁻⁷M y 10⁻⁶M medida mediante densidad óptica (DO) a 450nm. Los resultados se representan como media (±desviación estándar).A: simvastatina. B: atorvastatina. Los símbolos indican diferencias significativas para cada concentración de estatina comparado con las mismas condiciones de cultivo sin tratamiento.

*p<0.05 prueba T para la igualdad de medias (Test de t de Student)

2. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente subestudio indican que las estatinas (concretamente la simvastatina y la atorvastatina) inducen la diferenciación de los osteoblastos aumentando de esta manera la síntesis de la matriz ósea (osteóide) y permitiendo su posterior mineralización. La acción osteoformadora de las estatinas en nuestros resultados indica que no es producida por un aumento del número de osteoblastos en las superficies óseas sino por la inhibición de la proliferación celular, desviando la maquinaria celular hacia la transformación de éstas, en células secretoras diferenciadas.

Las estatinas o inhibidores específicos del enzima HMG-CoA reductasa actúan inhibiendo la síntesis hepática de colesterol, al bloquear el enzima HMG-CoA reductasa que está implicado en la síntesis del ácido mevalónico, precursor metabólico del colesterol.

Se ha descrito que las estatinas también realizan una acción local sobre las células óseas con una actividad osteoformadora. La reducción de los intermediarios de la ruta del mevalonato con la subsiguiente inhibición de la prenilación, provocada por las estatinas, es responsable de gran parte de los efectos pleiotrópicos de estos fármacos. El farnesil pirofosfato y el geranilgeraniol pirofosfato son intermediarios de la ruta de biosíntesis del colesterol y son necesarios para la prenilación de las guanosin trifosfatasa (GTPasas) como la Rho, Rac y Rap. La prenilación de estas proteínas es imprescindible para su activación ya que la adición del componente lipídico le permite la translocación a membrana donde tiene su actividad. Estas proteínas juegan papeles importantes en la proliferación y diferenciación celular, y la perturbación de su actividad tiene influencia en la actividad celular. De esta manera, la mayoría de los efectos pleiotrópicos de las estatinas (entre ellos en el hueso) son producidos en último término por el efecto que tienen sobre la prenilación de dichas proteínas. Las estatinas al inhibir la ruta de síntesis del mevalonato, disminuyen la disponibilidad de los intermediarios lipídicos usados como sustrato de la prenilación con lo que ésta queda inhibida actuando como factor limitante [Garret y Mundy, 2002](Figura 1).

Se ha descrito en estudios *in vitro* e *in vivo* que el colesterol inhibe la diferenciación osteoblástica [Parhami y col., 1997], [Parhami y col., 1999] y [Parhami y col., 2001]. De esta manera la inhibición de la biosíntesis del colesterol genera otro mecanismo de acción de posibles acciones pleiotrópicas de las estatinas, ya que al disminuir la concentración de colesterol por la acción de estas drogas se bloquea la acción inhibitoria de la diferenciación osteoblástica, promocionando la diferenciación de estas células.

La función principal de los osteoblastos es la formación ósea y los agentes que tienen una acción reguladora sobre la formación ósea pueden actuar incrementando o disminuyendo la replicación de las células de linaje osteoblástico y/o la función del osteoblasto diferenciado [Garret y Mundy, 2002].

Por este motivo el objetivo principal de este estudio fue analizar la respuesta a las estatinas a nivel de proliferación celular y de expresión génica del polipéptido $\alpha 1$ del colágeno tipo 1 (COL1A1), osteocalcina (BGP) y la *bone morphogenetic protein-2* (BMP-2) en cultivos de osteoblastos humanos procedentes de pacientes sanos y de la línea de osteosarcoma MG-63.

Existen numerosos estudios donde se ha profundizado en la identificación de las acciones que tienen estas fármacos sobre las células óseas y la mayoría de ellos coinciden en que el resultado final de su efecto es favorecer la formación ósea. De esta manera, nuestra intención al iniciar el trabajo fue analizar si este efecto se producía también en los osteoblastos primarios humanos ya que en la literatura no estaban descritos en este modelo los parámetros anteriormente citados.

Las estatinas también interfieren en la actividad de los osteoclastos provocando su apoptosis (similar efecto al de los bisfosfonatos) a través del mismo mecanismo que el descrito para los osteoblastos, a través de la inhibición de prenilación de proteínas que necesitan intermediarios de la ruta del mevalonato para que se produzca la prenilación y sean activas [Van Beek y Reekrs, 1999], [Fisher y col., 1999], [Luckman y col., 1998] y [Staal y col., 2003]. Este efecto descrito para los osteoclastos concuerda con los resultados obtenidos en nuestro estudio ya que al observar un efecto osteoformador (sin observarse un efecto estimulador de la proliferación de los osteoblastos) de las estatinas puede estar causado también por un aumento de la proporción osteoblasto/osteoclasto.

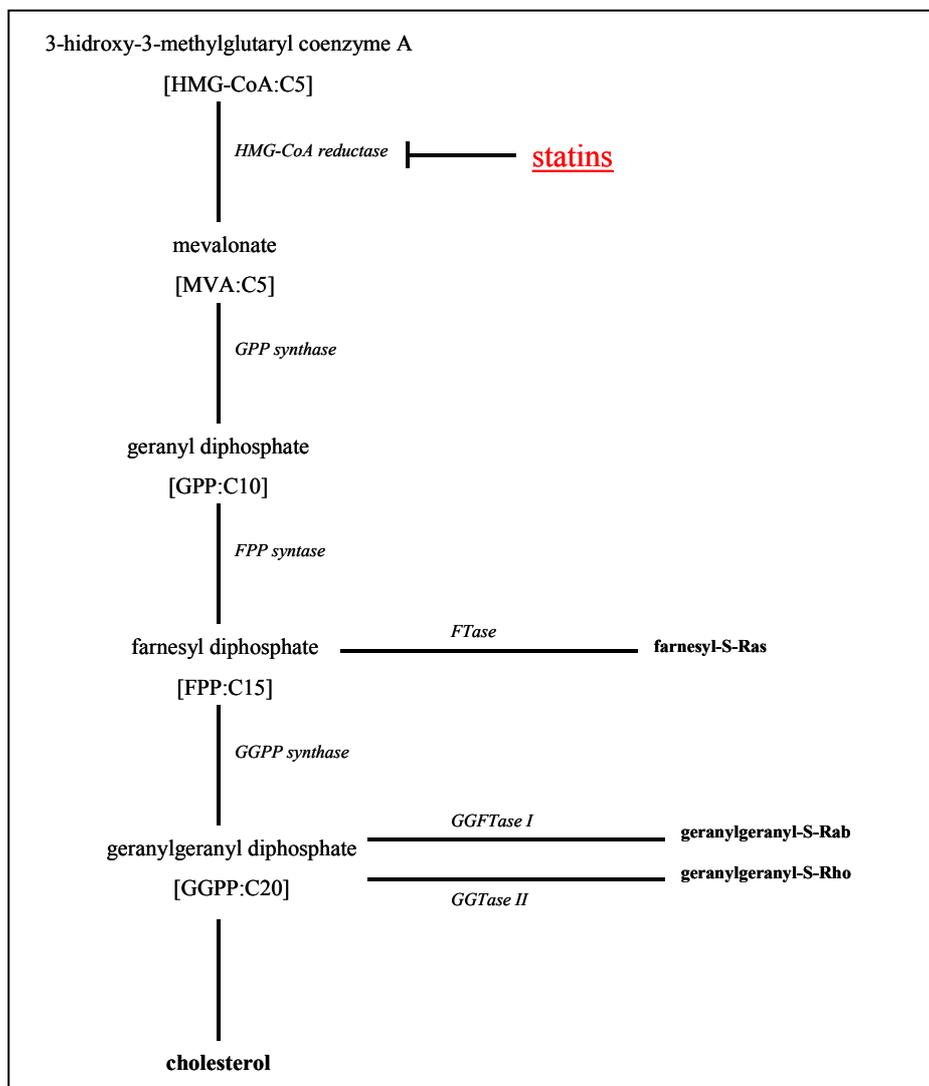


Figura 1: Acción de las estatinas sobre la ruta biosintética del colesterol [Koida y col., 2004. Esquema adaptado]

El paso previo al inicio del estudio experimental con las estatinas fue la caracterización celular del “pool” de osteoblastos primarios humanos, mediante la observación fenotípica, la histoquímica para la actividad fosfatasa alcalina y la determinación cualitativa de la expresión génica de osteocalcina. El “pool” de osteoblastos primarios procedía de la mezcla de células de tres pacientes sanos procedentes de hueso residual de cabeza de fémur obtenidos quirúrgicamente durante una intervención quirúrgica de prótesis de cadera. La mezcla de tres tipos celulares se realizó con la intención de minimizar los posibles sesgos producidos por las características individuales de cada paciente. Tras la caracterización de las células se afirmó que, efectivamente, se estaba trabajando con un línea celular formada mayoritariamente por osteoblastos.

Las células MG-63 no necesitaron de caracterización previa porque está ampliamente descrito en la literatura que se trata de una línea celular que mantiene el fenotipo osteoblástico con un patrón de expresión génica con pocas variaciones respecto al osteoblasto primario [Bilbe y col., 1996]. Por el hecho de tratarse de una línea tumoral las células no pierden su capacidad proliferativa ni de desarrollar las características de osteoblasto diferenciado a lo largo del cultivo celular. Carecen de inhibición por contacto por lo que el cultivo sigue creciendo a través del tiempo de forma indefinida.

2.1 TOXICIDAD DE LAS ESTATINAS SOBRE LOS OSTEOBLASTOS

El primer objetivo en este trabajo fue estudiar el efecto de las distintas concentraciones de simvastatina y atorvastatina sobre la viabilidad osteoblástica en dos tipos celulares: un “pool” de tres líneas celulares primarias y la línea de osteoblastos procedentes de osteosarcoma humano (MG-63). Los resultados indicaron que en las concentraciones analizadas no existía efecto tóxico de las estatinas sobre los osteoblastos

Fue necesario realizar el ensayo de viabilidad celular porque no existían estudios al respecto sobre el potencial absorbivo del fármaco, que tiene el tejido óseo de manera que no se podía realizar una correspondencia directa entre dosis administradas de estatinas al paciente y concentración de éstas en las superficies óseas. Como referencia para determinar las concentraciones que se probaron en este estudio se utilizó el rango de las que habían sido utilizadas por los grupos que habían trabajado con estos fármacos en cultivo celular *in vitro*. Asimismo se utilizó también como dato aproximado la concentración sérica de estatinas conseguida con la dosis oral de 20 mg al cabo de 1-2 horas post administración que alcanzaba una concentración máxima de 12.7-18.1 ng/ml [<http://www.fonendo.com/noticias/2/2000/11/2.shtml>]. Cuando se calculó la molaridad de esta concentración sérica se obtuvieron concentraciones de orden de magnitud similar a las testadas en el estudio (10^{-7} M/ 10^{-8} M). De todos modos el desconocimiento de la capacidad de permeabilidad a las estatinas por parte de las células óseas sugirió la necesidad de testar concentraciones del fármaco un orden de magnitud por encima y uno por debajo de las que se consiguen a nivel sérico. Finalmente fueron cuatro las concentraciones testadas (10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M y 10^{-6} M). Para analizar las diferentes concentraciones de las estatinas y ver como estas concentraciones afectaban la

viabilidad de los osteoblastos se realizaron test de viabilidad celular que determinaban el porcentaje de celular que morían por efecto del fármaco. Ninguna de las concentraciones probadas resultó nociva para la viabilidad de los osteoblastos ya que el porcentaje de viabilidad celular no resultaba ser estadísticamente inferior a la mortalidad celular observada en los controles de las células sin tratar. Estos resultados se observaron tanto en los osteoblastos primarios obtenidos de tres pacientes sanos como en la línea MG-63. De esta forma podemos concluir que la mortalidad celular que se observa en los test de viabilidad celular es debida a las causas naturales de muerte celular y a las condiciones propias del cultivo celular, sin que se pueda adjudicar a las estatinas. De esta manera se pudo afirmar que en osteoblastos las estatinas adicionadas, en las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo, no afectan a los mecanismos vitales de la célula. Por lo tanto todas las observaciones que se realicen se deberán a los efectos netos del fármaco sobre las células.

2.2 EFECTO DE LA SIMVASTATINA Y LA ATORVASTATINA SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

El segundo y tercer objetivo que se planteó en este trabajo fue determinar el efecto de las diferentes concentraciones de la simvastatina y atorvastatina sobre la proliferación celular. En el presente trabajo se observó que de forma general las estatinas provocaban la inhibición de la proliferación celular.

En la literatura se postula que las estatinas tienen un efecto anabólico sobre la formación ósea pero en ninguno de los estudios realizados hasta la actualidad se ha analizado la afectación directa que estos fármacos tenían sobre la proliferación celular siguiendo el modelo planteado en el presente estudio, donde se observaba la correspondencia directa entre la adición de estatinas en el medio y el porcentaje de división celular que se producía. Los resultados obtenidos en el “pool” de osteoblastos primarios en un primer momento parecían contradictorios ya que resultó que la proliferación celular disminuía de manera dosis-dependiente, produciéndose una disminución de la proliferación más evidente a las concentraciones más altas de estatinas. Este comportamiento se repetía de forma similar en las dos estatinas y con o sin la presencia de FCS en el medio. A la vista de estos resultados, se suscitan dos hipótesis mutuamente excluyentes. La primera de las posibles hipótesis sería pensar que las estatinas tienen un efecto tóxico sobre las células, de forma que a mayor concentración más muerte celular y, por lo tanto, menos osteoblastos replicándose con la consiguiente menor proliferación celular. Si esta hipótesis fuera demostrada se tendría que hablar de las estatinas como un agente apoptótico. Esta hipótesis se descartó ya que los experimentos de toxicidad celular resultaron negativos y por lo tanto la disminución de la proliferación no era debida a que se indujese un proceso apoptótico de las células presentes en el cultivo celular. La segunda posibilidad para explicar la inhibición de la proliferación celular observada en el presente estudio, sería que las células, bajo el efecto de las estatinas, producen un proceso de diferenciación celular desviando toda su maquinaria celular hacia la conversión de las células proliferativas en células secretoras productoras de matriz ósea. Esta hipótesis resultaría concordante con

los hallazgos citados en la literatura donde se postula que las estatinas tienen un claro efecto osteoformador. En el tejido óseo, solamente el 2% corresponde al volumen ocupado por las células y el resto son los componentes de la matriz extracelular. Por lo tanto se trata de un tejido conectivo donde las células no son las protagonistas del entramado histológico del mismo. Asimismo no tienen una función de soporte sino que su función es la formación y el mantenimiento de esta matriz extracelular. Por este motivo el factor crítico para el buen funcionamiento del tejido óseo no es el número de células presente sino la capacidad funcional que estas tienen sobre el metabolismo del hueso.

En el caso de las MG-63 a pesar de producirse una tendencia general a la disminución de la proliferación, no se observaba el claro efecto inhibitorio observado en el “pool”. Este resultado se puede explicar por la característica propia de una línea tumoral en que las células que la forman son células transformadas. Una de las transformaciones que han sufrido al convertirse en célula tumoral es la pérdida de la inhibición por contacto, que la lleva a dividirse indefinidamente en el tiempo. Esta capacidad replicativa tan fuerte parece que confiere a la célula una cierta insensibilidad sobre factores externos que modificarán esta proliferación.

Los resultados obtenidos en nuestro experimento a dosis no tóxicas de simvastatina y atorvastatina en referencia a la proliferación osteoblástica indican que las estatinas producen un efecto inhibitorio en la proliferación de los osteoblastos. Numerosos estudios demuestran que las estatinas tienen un importante efecto formador de hueso. *Mundy y col.* fueron los primeros en demostrar que en el cultivo de la línea murina 2T3 y la humana MG-63 de osteoblastos las estatinas (simvastatina, mevastatina y fluvastatina) producían un aumento de la expresión génica de la BMP-2 y que en cultivo de tejido óseo se observaba un aumento de formación ósea y de número de osteoblastos [Mundy y col., 1999], *Sugiyama y col.* demostraron que la compactina afectaba al promotor de la BMP-2 estimulando su expresión génica [Sugiyama y col., 2000]. Ambos grupos demostraron que el efecto de las estatinas sobre la BMP-2 estaba regulado por el efecto inhibitorio sobre la actividad del enzima HMG-CoA-reductasa [Mundy y col., 1999] y [Sugiyama y col., 2000]. Otros autores describieron el efecto de las estatinas en el aumento de la BMD, la ratio de formación ósea, el aumento de la expresión génica de osteocalcina, y el aumento de la resistencia a fracturas después de 6 semanas de tratamiento con cerivastatina en ratas OVX [Wilkie y col., 2000]. También se ha observado un efecto positivo de la simvastatina a la compresión de los cuerpos vertebrales en ratas adultas después de tres meses de tratamiento [Oxlund H 2000]. *Maeda y colaboradores* demostraron que en las células MC3T3-E1, la simvastatina promovía la diferenciación y mineralización de los osteoblastos, así como el aumento de la expresión génica de BMP-2 [Maeda, 2001]. En principio nuestros resultados serían contradictorios a los obtenidos por estos autores (menor en el caso de *Maeda y cols., 2001*, que postulan el efecto promotor de la diferenciación celular y mineralización). Sin embargo otros autores han descrito resultados similares a los nuestros. *Staal y col.* observaron una

disminución de la incorporación de la timidina triada en una línea primaria de calota por efecto de la simvastatina y la lovastatina [Staal y col., 2003], resultados parecidos a los obtenidos por nuestro grupo.

En estudios *in vitro* se ha visto que los inhibidores de HMG-CoA reductasa (estatinas) inhiben la proliferación de las células del músculo liso vascular o *vascular smooth muscle* (SMC). Las estatinas no solamente inhiben la síntesis de colesterol sino que también inhiben la síntesis de importantes intermediarios isoprenoides como el farnesilpírofosfato (FPP) y geranylgeranyl pirofosfato (GGPP). Los FPP y GGPP son lípidos que se unen a gran cantidad de proteínas durante las modificaciones post-traduccionales incluyendo las Ras y las Rho *GTP-binding proteins*. Cuando la Rho sufre la modificación post-traducciona uniéndose al GGPP produce una inhibición del factor de detención de la Cdk-2 (p27), factor arrestador del ciclo celular, y una estimulación de la síntesis de Cdk y Rb hiperfosforilada, estimuladores de la síntesis de DNA e inhibidoras también de la síntesis del factor inhibidor de la Cdk-2 (p27). Las estatinas actúan inhibiendo la modificación post-traducciona del Rho por ausencia de GGPP en el medio, y de esta forma el Rho, al no unirse al GGPP, pierde su localización a membrana y por lo tanto no actúa como estimulador de la síntesis de DNA lo que provoca una atenuación de la misma [Laufs U y col., 1999].

A la vista de los resultados obtenidos en nuestro estudio, donde se produce una disminución de la proliferación de los osteoblastos, pensamos que el mecanismo celular que produce el efecto atenuador de la proliferación seguido en el modelo osteoblástico podría ser el mismo que el descrito por las células SMC, producido a través de la inhibición de la prenilación de las Rho quinasas.

2.3 EFECTO DE LA SIMVASTATINA Y LA ATORVASTATINA SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DEL POLIPÉPTIDO α 1 DEL COLÁGENO TIPO 1 (COL1A1), LA OSTEOCALCINA Y LA PROTEÍNA MORFOGÉNICA ÓSEA-2 (BMP-2)

La tendencia al aumento de la expresión génica de BMP-2 (no significativo en el presente subestudio) y osteocalcina (significativo) que observamos en los resultados obtenidos con el efecto de la simvastatina y atorvastatina se encuentran ampliamente descritos en la literatura en distintos modelos celulares pero no en cultivo primario de osteoblastos humanos.

Se ha demostrado el efecto de las estatinas en el aumento de la expresión génica de la BMP-2 en cultivo de células osteoblásticas humanas MG-63 [Mundy y col., 1999]. También se ha demostrado el efecto de la pitavastatina al aumentar la expresión génica de la BMP-2 y de osteocalcina en cultivo primario de osteoblastos humanos a través del mecanismo inhibitorio de la Rho y la Rho quinasa en los osteoblastos humanos [Ohnaka y cols., 2001]. Este efecto se observó que no se obtenía con la incorporación al medio de mevalonato o geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) que son metabolitos que se encuentran por debajo de HMG-CoA en la vía biosintética. Esto sugirió que el mecanismo de acción de las estatinas estaba

relacionado con la inhibición de la HMG-CoA reductasa. Se propuso un mecanismo de actuación a través de la inhibición de la Rho-quinasa (que requiere de la geranylgeranylación para su correcta localización subcelular y activación) por parte de las estatinas, ya que se observó por un lado que la pitavastatina inhibe la translocación de RhoA y la activación de la Rho-quinasa y por otro que utilizando inhibidores de la Rho-quinasa se producía un aumento de la expresión génica de la BMP-2 y la osteocalcina. Por este motivo se consideró que la inhibición de la Rho-quinasa por parte de las estatinas era la causa del aumento de expresión génica de BMP-2 y osteocalcina [Ohnaka y col., 2001].

Las estatinas actúan inhibiendo la síntesis de los isoprenoides, afectando entre otras cosas al metabolismo de la vitamina K. Las distintas subclases de vitamina K difieren entre ellas por su cadena polisoprenil. La forma de vitamina K derivada de la dieta vegetal (filoquinona) se convierte en menaquinona-4 a través de la sustitución de una cadena de ácido graso por el isoprenoide geranylgeraniol derivado del mevalonato. Algunas proteínas que regulan la mineralización ósea, como la osteocalcina, *matrix Gla protein*, proteína S y Gas-6 están funcionalmente afectadas por la gamma carboxilación de los residuos de glutamato llevada a cabo por las carboxilasas vitamina K-dependientes [Berkner, 2000]. De esta manera, la inhibición de la síntesis de isoprenoides provocada por las estatinas reduce la conversión de la vitamina K de forma que esta está disponible para las carboxilasas, permitiendo la síntesis de las proteínas óseas dependientes de dicha hormona. De esta manera la inhibición de la conversión de la vitamina K termina con un efecto directo sobre el metabolismo del hueso, provocando un aumento de la mineralización ya que estas proteínas, y concretamente la osteocalcina, tienen un importante papel en este proceso [Demer, 2001]. Este mecanismo explicaría los resultados obtenidos en nuestro trabajo donde observamos un claro aumento de la expresión génica de osteocalcina dependiente de dosis con la adición de simvastatina y atorvastatina al medio.

La osteocalcina es la mayor proteína no colágena presente en la matriz ósea, producida por los osteoblastos maduros y se considera un marcador osteoblástico de diferenciación [Lian y col., 1999]. La significación fisiológica del aumento de osteocalcina no está clara. Recientemente se ha comunicado que la simvastatina promueve la diferenciación y la mineralización en cultivo de las células MC3T3-E1 [Maeda, 2001]. Nuestros resultados se adaptan bien al concepto de que las estatinas producen una diferenciación de los osteoblastos ya que observamos un aumento de la expresión génica de COL1A1, osteocalcina y BMP-2 dosis-dependiente, inversamente proporcional a la disminución de la proliferación celular.

En un estudio observacional de 30 mujeres posmenopáusicas tratadas con pravastatina se detectó un aumento de la concentración sérica del propéptido amino-terminal de procolágeno tipo 1, que es un marcador de formación ósea [Mostaza y col., 2001]. En cultivo de tejido óseo se observó un incremento significativo del volumen de hueso trabecular [Mundy y col., 1999]. Estos hallazgos son concordantes con los resultados obtenidos a nivel celular de cultivo primario de osteoblastos humanos y la línea MG-63 donde se detectó un aumento de la expresión génica del COL1A1 dosis-dependiente con simvastatina y atorvastatina, ya que un incremento en suero de los niveles de propéptido amino-terminal del

procolágeno tipo 1 es debido a un incremento de la expresión génica del colágeno tipo 1. Esto es así dado que en las modificaciones postraduccionales del colágeno se libera una molécula de la región aminoterminal por cada molécula de colágeno sintetizada por los osteoblastos a nivel local en las superficies óseas. Por otro lado un incremento del volumen de tejido trabecular también es debido en gran medida a un incremento de la síntesis de colágeno tipo 1, ya que se trata de la proteína mayoritaria del osteoide. El mecanismo a nivel molecular que explicaría estos hallazgos sería el mismo que el expuesto para explicar el incremento de la expresión génica de la BMP-2 y la osteocalcina a través de la inhibición de las Rho quinasas al inhibir la prenilación de estas proteínas, debido a la disminución de los metabolitos necesarios para que se produzca esta modificación de las Rho quinasas.

Los que a primera vista podrían parecer resultados contradictorios ya que de forma general se observa un efecto de la simvastatina y atorvastatina inhibidor de la proliferación celular y estimulador de la expresión génica de marcadores de diferenciación osteoblástica puede explicarse por la hipótesis ya postulada por otros autores anteriormente de que el efecto de las estatinas sobre los osteoblastos es activador de la diferenciación celular [Maeda y col., 2004]. De esta forma se explicaría porque se observa una disminución de la proliferación celular ya que esta se vería frenada por una desviación de la maquinaria celular hacia estadios osteoblásticos más diferenciados. Esta hipótesis se demuestra claramente por el extraordinario aumento de la expresión génica de osteocalcina y COL1A1 que se comporta de forma inversamente proporcional a la disminución de la proliferación celular, de forma que a las concentraciones donde la proliferación celular es menor, la expresión génica de osteocalcina y COL1A1 es mayor. Por lo tanto, si consideramos esta hipótesis cierta no entraríamos en contradicción con todos los hallazgos encontrados por los autores citados al principio ya que realmente se podría producir un aumento de la formación ósea por aumento de la deposición de matriz ósea sin que esta venga acompañada de un aumento del número de osteoblastos presentes en el hueso. De esta forma el conjunto de osteoblastos presentes en las superficies óseas se mantendría, dividiéndose a velocidades inferiores de lo que sería el comportamiento normal, y estos osteoblastos estarían llevando a cabo una mayor actividad formadora.

Por lo tanto podemos concluir que las estatinas tienen un efecto osteoformador dirigido a la diferenciación de los osteoblastos hacia una célula más activa capaz de sintetizar más matriz extracelular.

2.4 EFECTO DE LAS ESTATINAS SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR A LO LARGO DEL TIEMPO

Los efectos observados de la simvastatina y atorvastatina en la proliferación se correlacionan a través del tiempo de exposición ya que el efecto inhibitorio de la proliferación aumenta con el tiempo en todos los tipos celulares y en todos los momentos analizados. *Maeda y colaboradores*, demostraron el efecto cambiante de las estatinas donde primeramente estas provocaban un aumento de la expresión de BMP-2 y posteriormente inducían la síntesis de marcadores osteoblásticos típicos de estadios más avanzados de

diferenciación [Maeda y col., 2004]. Por este motivo en los resultados de la proliferación en algunos no detectamos diferencias estadísticamente significativas a las 24 horas y en cambio a las 96 horas observamos una clara disminución de la proliferación dosis-dependiente ya que en este momento ya se hace evidente el cambio celular hacia la expresión génica de marcadores típicos de un osteoblasto más diferenciado.

Montagnani y colaboradores, realizaron un estudio *in vivo* de la administración de simvastatina a través del tiempo administrando diariamente 40 mg de simvastatina y analizaron los efectos sobre el hueso a través de la determinación de la densidad mineral ósea, observando que se producía un incremento de la misma [Montagnani y col., 2003]. Estos resultados corroboran nuestros hallazgos donde postulamos que, efectivamente, al potenciar la diferenciación de los osteoblastos aumenta la síntesis de las proteínas formadoras de la matriz ósea con el consiguiente aumento de la cantidad de tejido óseo.

VIII. Subestudio IV

CULTIVO PRIMARIO DE OSTEÓBLASTOS DE VARONES CON OSTEOPOROSIS IDIOPÁTICA. ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DEL COLÁGENO TIPO 1 Y LA OSTEÓCALCINA IMPLICADOS EN LA SÍNTESIS DE LA MATRIZ ÓSEA.

HIPÓTESIS DE TRABAJO: La osteoporosis masculina idiopática está causada por una disminución de la función osteoblástica, a través de la disminución de la proliferación de los osteoblastos y/o por una menor actividad intrínseca de dichas células.

OBJETIVOS:

1. Determinar *in vitro* si existen diferencias en la proliferación osteoblástica entre un grupo de varones con osteoporosis idiopática y un grupo de varones sanos.
2. Determinar *in vitro* diferencias en los niveles de expresión génica del polipéptido $\alpha 1$ del colágeno tipo 1 y la osteocalcina entre las líneas de osteoblastos primarios de pacientes varones con osteoporosis idiopática y un grupo de varones sanos.
3. Determinar *in vitro* diferencias en el efecto de la vitamina D sobre la expresión génica del polipéptido $\alpha 1$ del colágeno tipo 1 y la osteocalcina entre las líneas de osteoblastos primarios de varones con osteoporosis idiopática y un grupo de varones sanos.

1. RESULTADOS

1.1 PACIENTES SELECCIONADOS

Para la realización de este apartado del trabajo se obtuvieron un total de 30 muestras de biopsia de cresta ilíaca de pacientes seleccionados previamente en función de su patología osteoporótica determinada por densitometría ósea (siguiendo los criterios densitométricos de la OMS que tienen en cuenta los valores de Tscore). Del total de muestras, 14 procedían de pacientes varones con osteoporosis idiopática, confirmada mediante estudio histológico y 16 pacientes sin patología ósea metabólica asociada ni antecedentes patológicos de interés, intervenidos quirúrgicamente por lesiones secundarias a traumatismo osteoarticular, seleccionados por edad. Todos los sujetos del estudio fueron informados de los objetivos del mismo y con anterioridad a su inclusión se les solicitó consentimiento informado. A los pacientes con sospecha clínica de osteoporosis idiopática, y que cumplían los criterios de inclusión, se les ingresó durante 24 horas en el Hospital del Mar para realizarles un estudio que incluía: densitometría ósea, estudio bioquímico del remodelado óseo, extracción de sangre periférica y biopsia ósea transilíaca, previo marcaje con tetraciclinas. La biopsia transilíaca permitió confirmar el diagnóstico de osteoporosis. Los dos grupos formados tenían edades similares, siendo 55.72 ± 17.9 años en el grupo de pacientes osteoporóticos y 56.54 ± 12 años en el grupo de controles sanos no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre las edades de los grupos. El índice de masa corporal fue de 26.4 ± 2.8 kg/m² en el grupo de pacientes osteoporóticos y de 27.6 ± 3.6 kg/m² en el grupo de pacientes sanos no existiendo tampoco diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

1.2 BIOPSIA DE CRESTA ILÍACA

Se obtuvieron las biopsias transilíacas mediante el método estandarizado usando un trocar de Bordier de 7 mm de diámetro interno. El cilindro obtenido se escindió longitudinalmente mediante la técnica descrita por *Bartl* [*Bartl y col.*, 1982]. Una mitad de la biopsia se utilizó para cultivo de osteoblastos y la otra se procesó con fines diagnósticos.

1.3 PROLIFERACIÓN CELULAR EN OSTEOLASTOS PRIMARIOS DE VARONES OSTEOPORÓTICOS Y CONTROLES SANOS

La determinación de la proliferación celular es un parámetro indicativo de la capacidad de proliferación de las células y de la velocidad a la que se produce el crecimiento. Para medir la proliferación celular se realizaron curvas de crecimiento a lo largo de 14 días de cultivo para poder evaluar el comportamiento en todos los estadios que se producen a lo largo del proceso de crecimiento de una línea celular osteoblástica.

Con la intención de mantener la memoria del tejido primitivo y evitar posibles transformaciones celulares propias del proceso de subcultivo, los experimentos de determinación de la proliferación celular se

realizaron en todos los casos en el primer pase del cultivo primario. El recuento de las células se realizó con la cámara de neuvauer. Los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar (DE).

Las figuras 1 y 2, muestran las curvas de proliferación celular para cada una de la líneas celulares analizadas realizando un triple recuento de cada tiempo en cada una de las líneas. Cada uno de los puntos que aparecen en las representaciones de las curvas de crecimiento corresponde a las horas de incubación donde se realizó el recuento de número de células. En las gráficas se muestra que todas las líneas celulares analizadas seguían la estructura de crecimiento típica de los osteoblastos en condiciones *in vitro*. Para corroborar esta observación se determinó la regresión lineal de las curvas de crecimiento, dando en todos los casos valores aceptables de regresión. Visualmente en las figuras 1 y 2 se observa que de forma general las líneas de pacientes sanos (controles) mostraban una fase de latencia más corta ya que rápidamente se iniciaba el crecimiento exponencial. Asimismo, de la observación general del comportamiento de las células de cada uno de los pacientes incluidos en el estudio se observó la existencia una gran variabilidad interindividual dentro de la homogeneidad general.

En la tabla 1 se muestran los resultados numéricos de los recuentos celulares en cada tiempo analizado de los dos grupos de estudio.

Tabla 1: Cuantificación de la proliferación mediante de curvas de crecimiento celular mediante el recuento del número de células/pocillo a diferentes tiempos de crecimiento en los dos grupos de estudio (osteoporóticos/ no osteoporóticos)

Proliferación osteoblástica	osteoporosis	no osteoporosis
N(número de muestras)	14	16
0 horas (n°células/pocillo) X±DS	20000±0.00	20.000±0.00
48 horas (n°células/pocillo) X±DS	15997±4756	17639±6103
96 horas (n°células/pocillo) X±DS	24497±6354	32901±19136
144 horas (n°células/pocillo) X±DS	40265±11408	54164±34126
192 horas (n°células/pocillo) X±DS	53425±19214 (*1)	77725±50591(*1)
264 horas (n°células/pocillo) X±DS	82363±26387	118294±59465
336 horas (n°células/pocillo) X±DS	107549±40227	147025±67334
AUC (área bajo curva) X±DS	633619±230330 (*2)	967850±445191 (*2)

*p<0.05 prueba T para igualdad de medias (test de t de Student) *1: p=0.04 *2: p=0.02

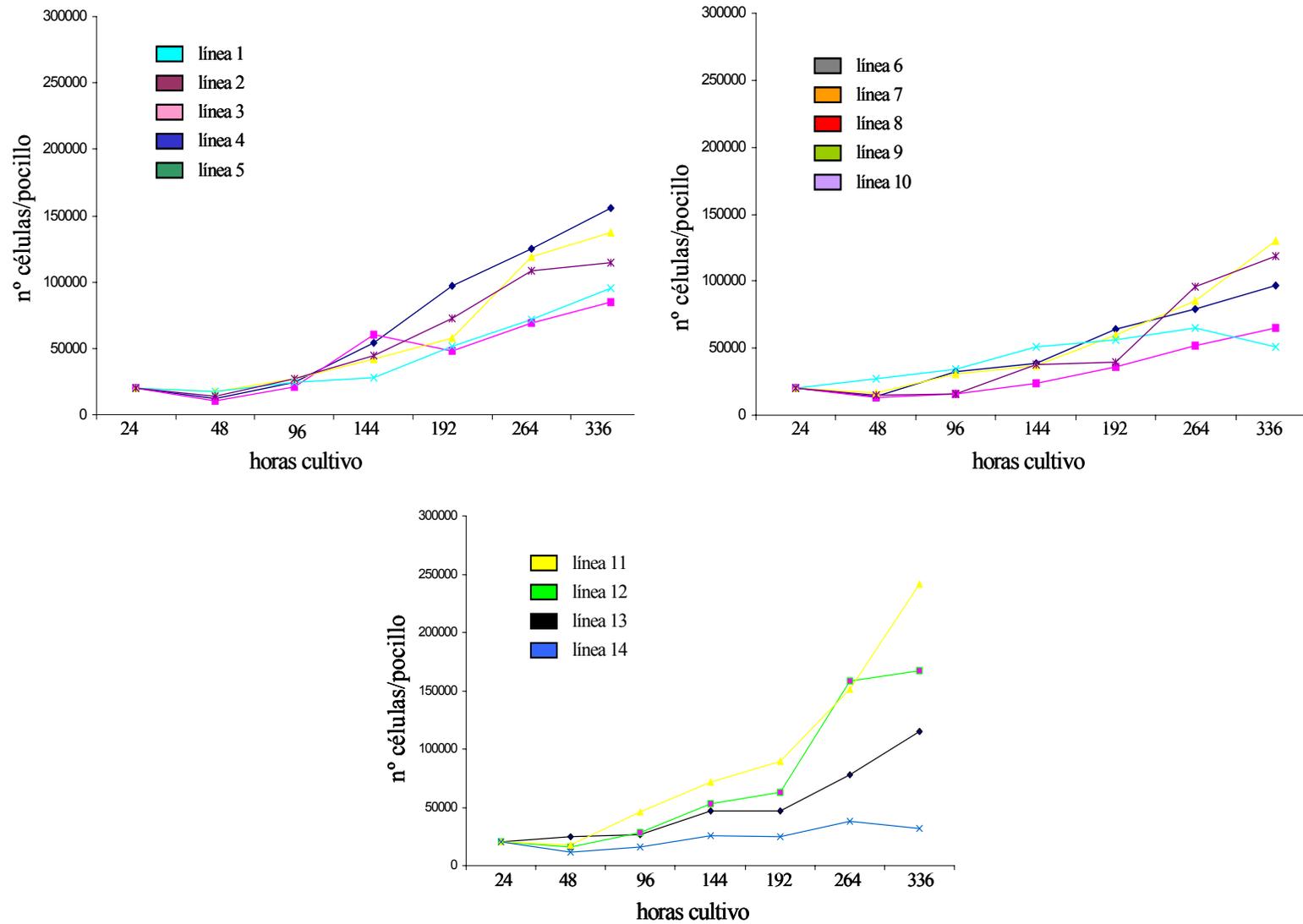


Figura 1: En la gráfica se observan las curvas de proliferación de cada una de las líneas pertenecientes al grupo de estudio de pacientes osteoporóticos. En todos los casos observamos el comportamiento típico del crecimiento de una población osteoblástica, con una fase de latencia, una exponencial y una estacionaria. Los gráficos representan el número de células por pocillo (se representa la media del número de células) en cada uno de los tiempos analizados (24, 48, 96, 144, 192, 264 y 336 horas de cultivo)

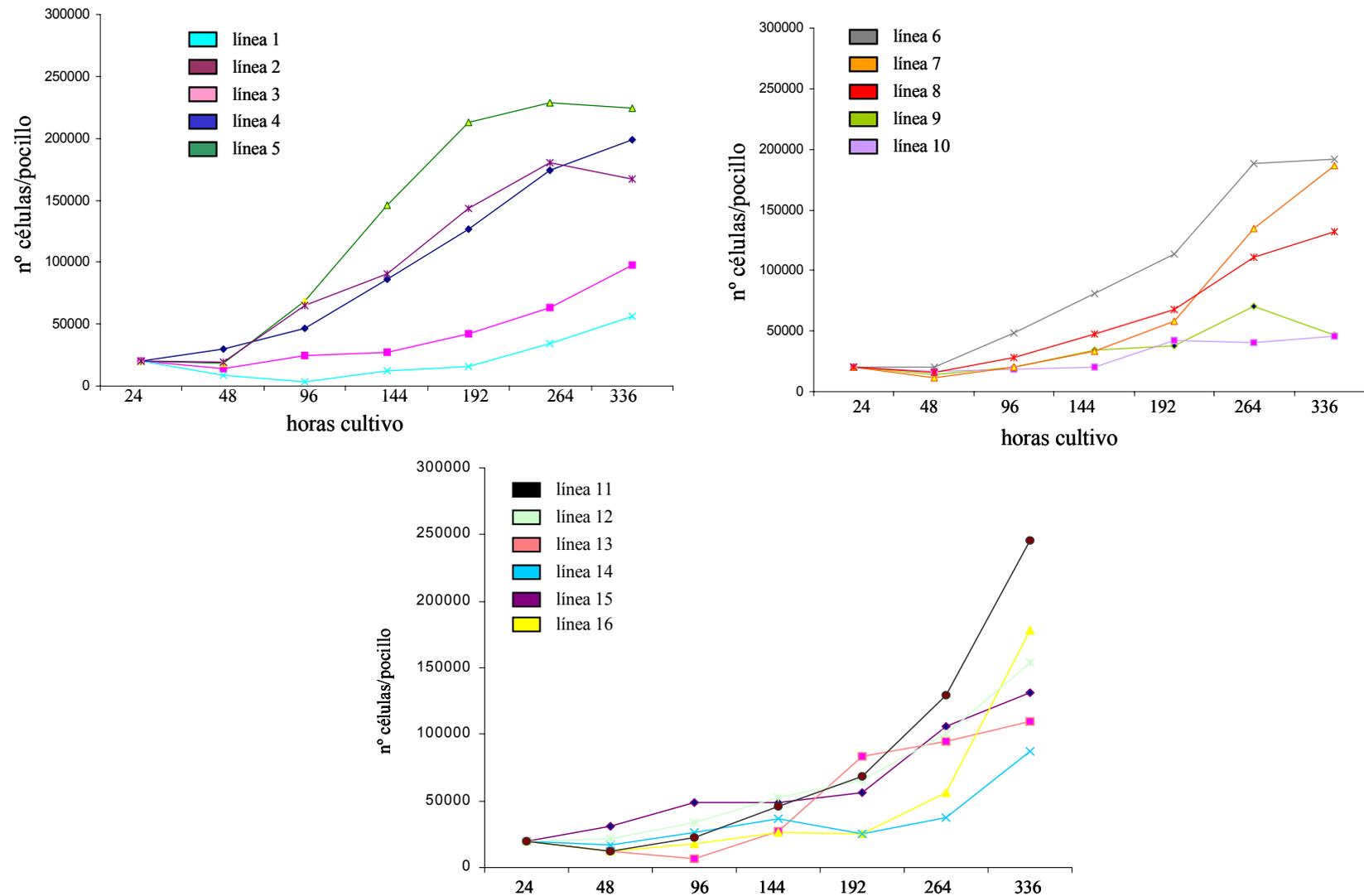


Figura 2: En la gráfica se observan las curvas de proliferación de cada una de las líneas pertenecientes al grupo de estudio de controles no osteoporóticos. En todos los casos observamos el comportamiento típico del crecimiento de una población osteoblástica, con una fase de latencia, una exponencial y una estacionaria. Los gráficos representan el número de células por pocillo (se representa la media de células del número de células) en cada uno de los tiempos analizados (24, 48, 96, 144, 192, 264 y 336 horas de cultivo)

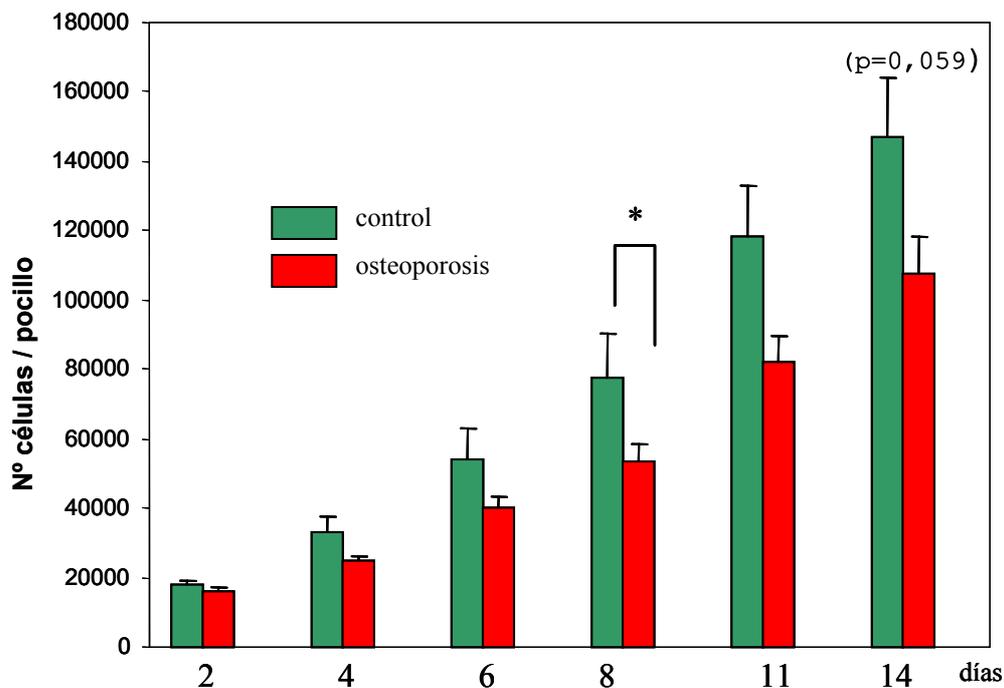


Figura 3: Número absoluto de células por pocillo en cada uno de los días de crecimiento (media \pm error estándar) del grupo de pacientes osteoporóticos y del grupo control de pacientes no osteoporóticos.

* $p < 0.05$ prueba T para la igualdad de medias (test de t de Student).

En la figura 3 se presenta la densidad celular en cada uno de los tiempos analizados en el ensayo de la curva de crecimiento celular. Se observó que en todos los tiempos de incubación la densidad celular era menor en el grupo de pacientes osteoporóticos. Esta diferencia se fue evidenciando de forma más marcada a medida que aumentaba el tiempo de incubación de las muestras siendo estadísticamente significativa a los 8 días de incubación ($p=0.045$, test de t de Student). A los 11 días de crecimiento la diferencia siguió siendo notoria sin alcanzar significación estadística. Finalmente el día 14 de crecimiento la diferencia de densidad celular era inferior de forma marginalmente significativa ($p=0.059$, Test de t de Student), con lo que se pudo afirmar que se mantiene la clara tendencia a la disminución de la proliferación en las líneas osteoblásticas procedentes de pacientes con osteoporosis idiopática.

En cada una de las curvas celulares realizadas se calculó el área bajo la curva. Este parámetro representa la integral de la función curva y es un indicativo muy robusto de la capacidad de crecimiento total que tiene la línea sin tener en cuenta el modelo de crecimiento seguido. Se trata de un valor absoluto que carece de unidades (figura 4). Los valores de AUC (Área Bajo la Curva) fueron significativamente inferiores en las muestras de pacientes osteoporóticos ($p=0.02$, test de t de Student)(tabla 1).

1.4 EXPRESIÓN GÉNICA DEL POLIPÉPTIDO α 1 DEL COLÁGENO TIPO 1 Y LA OSTEOCALCINA EN OSTEOLASTOS PRIMARIOS DE VARONES OSTEOPORÓTICOS Y CONTROLES SANOS

Con el objetivo de determinar cuantitativamente si existía una expresión génica diferencial entre el grupo de pacientes con osteoporosis idiopática y el grupo control de pacientes sanos, se realizó la determinación cuantitativa por PCR a tiempo real de la expresión génica de los transcritos de colágeno y osteocalcina. Las células se cultivaron en placas de seis pocillos hasta llegar a la confluencia, se sincronizaron durante 48 horas, y posteriormente se incubaron durante 24 en medio de cultivo sin FCS (basal) y con o sin el estímulo de 10^{-8} M de vitamina D. Posteriormente a la extracción de RNA y la posterior reacción de la transcriptasa reversa se realizó la PCR a tiempo real para cuantificar los niveles de expresión génica del COL1A1 y la osteocalcina. Las reacciones de PCR a tiempo real se realizaron por triplicado por cada una de las muestras y de los genes. Los resultados se expresaron en forma de expresión relativa utilizando el gen de la β -actina como control endógeno (expresión relativa del gen problema = copias del gen problema/copias de β -actina).

Previamente a la cuantificación de la expresión génica se evaluó cualitativamente la expresión génica de COL1A1 u osteocalcina por parte de los osteoblastos pertenecientes a las muestras del subestudio, confirmando la presencia de expresión génica en los dos casos (Figura 4)

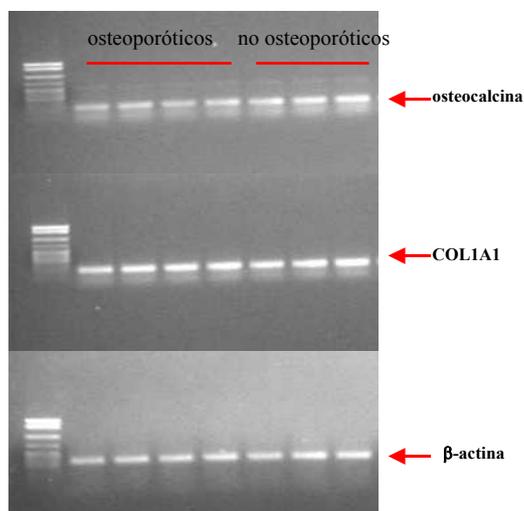


Figura 4: Análisis de la RT-PCR de los transcritos de los genes del COL1A1 y la osteocalcina. Las bandas superiores corresponden a los fragmentos amplificados del COL1A1 y la osteocalcina. Se utilizó la β -actina como control endógeno de la reacción.

1.4.1 Expresión génica del COL1A1 en osteoblastos primarios de varones osteoporóticos y controles sanos

En el análisis de la expresión génica del COL1A1 en los dos grupos de pacientes del estudio se obtuvieron valores inferiores en el grupo de pacientes osteoporóticos tanto cuando se añadió vitamina D en el medio como sin este estímulo, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Tampoco se observó efecto de la presencia de vitamina D al medio sobre la expresión del COL1A1 ya que los niveles de expresión génica fueron similares cuando se comparó un mismo grupo en función de la vitamina D (Tabla 2).

Tabla 2: Expresión relativa del COL1A1 en las líneas celulares de las pacientes osteoporóticas y del grupo control.

COL1A1	Osteoporosis (14)	No osteoporosis(16)	p (test de t de Student)
Basal	1.58±0.35	2.28±0.46	0.24
Vitamina D	1.74±0.25	2.19±0.54	0.47

(X±error estándar)

1.4.2 Expresión génica de la osteocalcina en osteoblastos primarios de varones osteoporóticos y controles sanos

En el análisis de la expresión génica de osteocalcina en los dos grupos de pacientes del estudio se obtuvieron valores significativamente inferiores en el grupo de pacientes osteoporóticos en condiciones de cultivo estimulados con vitamina D ($p=0.037$, test de t de Student). Se observó un claro efecto estimulador de la expresión génica producido por la vitamina D ($p<0.05$, test de t de Student) (Tabla 3).

Tabla 3: Expresión relativa de la osteocalcina en las líneas celulares de las pacientes osteoporóticas y del grupo control.

Osteocalcina	Osteoporosis (14)	no osteoporosis(16)	p (test de t de Student)
basal	0.10±0.07	0.06±0.03	0.60
vitamina D	1.58±0.32	2.76±0.42	0.03*

(X±error estándar. * $p<0.05$ (test de t de Student))

2. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente subestudio confirman la hipótesis de trabajo formulada ya que los resultados obtenidos permitieron demostrar que los osteoblastos procedentes de pacientes varones con osteoporosis idiopática, tienen su capacidad proliferativa disminuida y un defecto intrínseco que afecta a la expresión de los genes implicados en la deposición de la matriz y la mineralización de esta. Efectivamente, en el caso de la proliferación se demostró que esta era estadísticamente inferior que el grupo control. En el caso de la expresión génica del COL1A1 había una tendencia a la disminución sin significación estadística. Por último, la osteocalcina si que se encontraba disminuida de forma estadísticamente significativa en el grupo de pacientes osteoporóticos.

La osteoporosis masculina es una enfermedad menos estudiada que la osteoporosis posmenopáusicas femenina debido a su menor prevalencia en la población, por ello es importante hacer todo tipo de esfuerzos para intentar dilucidar la naturaleza de la enfermedad.

En este capítulo se realizó un estudio de casos y controles donde se pretendía estudiar si existía un defecto intrínseco de los osteoblastos independiente de los factores paracrinos extracelulares, en osteoblastos trabeculares procedentes de pacientes con osteoporosis idiopática que se comparó con un grupo control de pacientes no osteoporóticos apareados por edad.

En la primera fase de este trabajo se establecieron los cultivos primarios de los osteoblastos trabeculares obtenidos a partir de la biopsias de cresta ilíaca a las que fueron sometidos los pacientes incluidos en este estudio.

Cada una de las líneas de cultivo primario obtenida de cada uno de los pacientes incluidos en el estudio, fue caracterizada mediante histoquímica para la reacción de la fosfatasa alcalina y la detección cualitativa de la expresión génica de la osteocalcina, que son importantes marcadores de fenotipo osteoblástico. Tras la caracterización de cada una de las líneas resultó que todas ellas se podían considerar líneas formadas casi exclusivamente por osteoblastos.

Una vez caracterizado el cultivo primario como modelo experimental se realizaron subcultivos celulares de las líneas para realizar los experimentos diseñados como objetivos del estudio. En todos los experimentos se trabajó en el primer subcultivo para mantener la homogeneidad entre las diferentes líneas primarias y porque además está descrito que en el primer pase del cultivo es cuando mejor se guarda la memoria de las condiciones de crecimiento del tejido original y por lo tanto nos permitirá estimar mejor el comportamiento que podría tener la célula dentro del tejido óseo.

Partiendo de la evidencia científica que postula que los varones con osteoporosis idiopática tienen alterada la funcionalidad de las células osteoblásticas, lo que provoca un balance global de disminución de la masa ósea debido a elementos intrínsecos del propio osteoblasto o a procesos extrínsecos de regulación paracrina [Darby y Meunier, 1981], [Arlot y col., 1984] y [Parfitt y col., 1992], se diseñó el

presente estudio con la intención de valorar distintos aspectos de la funcionalidad de los osteoblastos en un modelo *in vitro* de cultivo de osteoblastos primarios de pacientes afectados de osteoporosis primaria. Partiendo de la base de que el cultivo primario de osteoblastos humanos era un buen modelo para el estudio de patologías óseas (ya discutido en el primer subestudio), la idea genuina de este trabajo fue estudiar los osteoblastos como posibles determinantes patológicos de la enfermedad. La hipótesis básica suponía que el osteoblasto de los varones con osteoporosis idipática tenían un defecto intrínseco independientemente de los factores sistémicos y paracrinicos que lo condicionan *in vivo* dentro del tejido óseo. Estos defectos de “*imprinting*” o “*back ground*” genético permanecerían en las células y por lo tanto deberíamos ser capaces de detectarlos en un modelo aislado de cultivo celular *in vitro*. De esta forma identificaríamos un funcionamiento diferencial de estos osteoblastos cuando no están expuestos a agentes externos que los estimulen o los inhiban. El trabajo se diseñó con la intención de identificar diferentes marcadores de funcionalidad celular relacionados con los osteoblastos. Asimismo los parámetros que se tuvieron en cuenta fueron el estudio de la proliferación osteoblástica y la determinación de la expresión génica de grupos de genes implicados en la formación de la matriz ósea (COL1A1 y osteocalcina).

2.1 PROLIFERACIÓN CELULAR

Los resultados obtenidos en este experimento son concordantes con algunos trabajos publicados en la literatura donde se postuló que los pacientes afectos de osteoporosis idiopática tienen funcionalidad celular reducida a nivel de la proliferación de los osteoblastos [Marie y col., 1991], [Marie y De Vernejoul, 1993] y [Battmann y col., 1997]. Efectivamente, con el diseño experimental utilizado en nuestro estudio, las curvas de proliferación celular, indicativas de la capacidad de proliferación de las poblaciones celulares de las líneas celulares incluidas en el estudio, mostraron que la proliferación celular estaba disminuida en los osteoblastos procedentes de pacientes con osteoporosis idiopática, resultados que permitieron afirmar que la capacidad de división celular de los osteoblastos provenientes de dichos pacientes se veían alterados debido a un defecto intrínseco del osteoblasto que afectaría al ciclo celular.

Al realizar el recuento en número absoluto de células en los diferentes tiempos de incubación analizados se observó que en todos ellos era mayor en el grupo de pacientes sanos utilizados como control, y esta diferencia se hacía cada vez más importante al aumentar el tiempo de incubación llegando a ser significativa a los 8 días donde la proliferación celular se encuentra en fase exponencial y casi significativa a los 14 días de incubación donde el cultivo celular se encuentra en fase estacionaria de crecimiento celular. Esta observación se vio corroborada con la disminución del área bajo la curva encontrada en las poblaciones osteoblásticas procedentes de pacientes con osteoporosis idiopática que es un dato robusto indicativo de la capacidad de proliferación de una población celular. Esta observación realizada en condiciones basales del cultivo primario permitió extrapolar que los pacientes con osteoporosis idiopática, cuando en las superficies óseas se requiere de la proliferación osteoblástica para

el inicio de la etapa de formación ósea del remodelado, consiguen un “pool” de osteoblastos menor que en el caso de los pacientes sanos. Este hallazgo se puede explicar mediante dos hipótesis que no son excluyentes pero que con el diseño experimental utilizado en este trabajo no nos permite afirmar cual de ellas es más probable. La primera de las hipótesis supone la existencia de un defecto osteoblástico de “*imprinting*” o “*background*” genético que afecta la maquinaria celular relacionada con la replicación celular, con lo que se supone que estos osteoblastos osteoporóticos tendrían afectados genes responsables de la proliferación celular, sin que este defecto provoque un bloqueo aunque sí una atenuación de la velocidad normal de la división celular. La otra hipótesis que podría explicar los resultados obtenidos sería un aumento de la apoptosis por parte de los osteoblastos provenientes de pacientes con osteoporosis idiopática. De esta forma el defecto osteoblástico estaría relacionado con los genes encargados de desencadenar la respuesta de apoptosis a la célula. De esta manera al aumentar la proporción de osteoblastos apoptóticos, disminuiría el “pool” de osteoblastos viables capaces de proliferar y esto se manifestaría como una disminución neta del número de osteoblastos. En un futuro para discernir entre ambas posibilidades sería interesante realizar un test de viabilidad celular que nos permitiría estudiar en cada uno de los tiempos de incubación utilizados la proporción de células viables existentes y la cantidad de células que han entrado en apoptosis. De esta forma podríamos identificar de forma mucho más precisa el defecto celular que tienen los osteoblastos.

También sería interesante diseñar estudios futuros para describir el mecanismo celular que provoca la disminución de la proliferación celular en esta patología. Este sería un objetivo ambicioso ya que la regulación de la proliferación y diferenciación celular es el resultado de la interacción entre programas endógenos de expresión génica y señales externas proporcionadas por hormonas, factores de crecimiento, y por contactos célula-célula. La integración de estas señales determina que la célula prolifere, se diferencie o sufra un proceso de muerte celular programada o apoptosis. A través de los mecanismos moleculares por los cuales las señales del exterior, particularmente las mediadas por la acción de factores de crecimiento y por las interacciones célula-célula, se transmiten al núcleo celular estimulando la progresión en el ciclo celular, y la replicación del DNA, o alternativamente, inhibiendo la proliferación o induciendo la diferenciación celular.

En la literatura se define que en la osteoporosis posmenopáusica el fenómeno predominante causante de la disminución de la densidad mineral ósea es el aumento de la resorción. En cambio en la osteoporosis masculina idiopática se habla en general de un defecto osteoblástico como la causa más importante de la enfermedad. Estas afirmaciones son corroboradas por nuestros resultados expuestos en el subestudio 2 de los resultados, donde observamos que en el grupo de pacientes con osteoporosis posmenopáusica no se observan diferencias en la proliferación celular con el grupo de pacientes no osteoporóticas utilizadas como control. En cambio en el grupo de pacientes varones afectados de osteoporosis masculina idiopática existe una disminución significativa de la proliferación celular.

2.2 EXPRESIÓN GÉNICA DEL POLIPÉPTIDO $\alpha 1$ del COLÁGENO TIPO 1 Y LA OSTEOCALCINA

La disminución de la expresión génica de la osteocalcina y COL1A1 nos permitió afirmar que la patología osteoporótica que se manifiesta *in vivo* con una disminución de la densidad mineral ósea y la alteración de los marcadores del remodelado óseo en los pacientes varones que padecen osteoporosis, se reproduce en condiciones *in vitro* y es debida en parte a un defecto intrínseco de los osteoblastos independientemente de los factores sistémicos y paracrinos que actúan en el hueso, manifestado en una disminución de la expresión génica del COL1A1 y de la osteocalcina. Este defecto intrínseco sería debido a los procesos de “*imprinting*” o causado por defectos de “*background*” genético.

En la determinación de la disfunción de los osteoblastos procedentes de pacientes con osteoporosis primaria, varios autores han realizado estudios en la misma línea con la intención de completar los datos existentes sobre el mecanismo patológico de esta enfermedad.

Marie y De Vernejoul encontraron, en cultivo *in vitro* de osteoblastos humanos, que los procedentes de pacientes con osteoporosis primaria tenían disminuida la proliferación celular sin que la función celular a nivel de síntesis proteica se viera afectada [*Marie y De Vernejoul*, 1993]. Contrariamente otros autores, encontraron una anomalía funcional de los osteoblastos de pacientes osteoporóticos reflejada como una disminución de la síntesis proteica [*Wong y col.*, 1994]. Finalmente también se ha encontrado una afectación intrínseca de los osteoblastos osteoporóticos que afectaba a la proliferación celular y a la síntesis proteica expresada en forma de disminución de la síntesis de osteocalcina [*Battmann y col.*, 1997].

El colágeno tipo 1 y la osteocalcina son dos proteínas claves para la formación de la matriz ósea y su posterior mineralización, lo que es la función más importante de los osteoblastos (células formadoras de hueso) de esta forma representan dos marcadores claves para la determinación de la funcionalidad osteoblástica a nivel de síntesis de la matriz extracelular y su posterior mineralización.

Los resultados obtenidos en la determinación de la expresión génica de COL1A1 y la osteocalcina fueron concordantes con los encontrados en la literatura ya que, tal y como habían encontrado la mayoría de los autores, existe una disminución de la expresión génica de osteocalcina y COL1A1 en los osteoblastos osteoporóticos.

IX. Conclusiones

1. Subestudio I

- El cultivo primario de osteoblastos es un buen modelo para el estudio de patologías metabólicas óseas (como la osteoporosis) y el efecto de factores y fármacos en el hueso.

2. Subestudio II

- Los osteoblastos procedentes de pacientes con osteoporosis posmenopáusica tienen un defecto que afecta a la expresión de genes característicos de la función osteoblástica.
 - La expresión génica de OPG disminuye en osteoblastos en condiciones basales procedentes de pacientes con osteoporosis posmenopáusica.
 - La expresión génica de OPG disminuye en osteoblastos estimulados con vitamina D procedentes de pacientes con osteoporosis posmenopáusica.
 - La expresión génica de OPG disminuye en osteoblastos tratados con 17β -estradiol procedentes de pacientes con osteoporosis posmenopáusica.
 - La expresión génica de COL1A1 disminuye en osteoblastos en condiciones basales procedentes de pacientes con osteoporosis posmenopáusica.

3. Subestudio III

- Las estatinas (simvastatina y atorvastatina) afectan a la función osteoblástica favoreciendo la diferenciación a través de la inhibición de la proliferación celular y el incremento de la expresión de genes característicos del osteoblasto diferenciado con elevada actividad secretora.
 - Las estatinas (simvastatina y atorvastatina) producen una disminución de la proliferación celular en osteoblastos humanos.
 - Las estatinas (simvastatina y atorvastatina) producen un aumento de la expresión génica de COL1A1, osteocalcina y BMP-2.

4. Subestudio IV

- Los osteoblastos procedes de pacientes con osteoporosis masculina idiopática tienen un defecto que afecta a la proliferación celular y a la expresión de genes característicos de la función osteoblástica.
 - La proliferación celular disminuye en osteoblastos procedentes de pacientes varones con osteoporosis idiopática.
 - La expresión génica de osteocalcina disminuye en osteoblastos tratados con vitamina D procedentes de pacientes varones con osteoporosis idiopática.
 - La expresión génica de COL1A1 disminuye en osteoblastos en condiciones basales procedentes de pacientes varones con osteoporosis idiopática.

X. Bibliografía

A

Agerbaek MO, Eriksen EF, Kragstrup J, Mosekilde L, Melsen F. A reconstruction of the remodelling cycle in normal human cortical iliac bone. *Bone Miner.* 1991;12:101-12.

Akatsu T, Murakami T, Nishikawa M, Ono K, Shinomiya N, Tsuda E, Mochizuki S, Yamaguchi K, Kinoshita M, Higashio K, Yamamoto M, Motoyoshi K, Nagata N. Osteoclastogenesis inhibitory factor suppresses osteoclast survival by interfering in the interaction of stromal cells with osteoclast. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;250:229-34.

Albright F. *Annals of internal medicine*, Volume 27, 1947: Osteoporosis. *Nutr Rev.* 1947;47:85-6.

Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature.* 1997;390:175-9.

Arlot M, Edouard C, Meunier PJ, Neer RM, Reeve J. Impaired osteoblast function in osteoporosis: comparison between calcium balance and dynamic histomorphometry. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1984;289:517-20.

Arrighi HM, Hsieh A, Khoo H, Reyes A, Asbury D, Campbell P, Yanagihara D, Chang D, Bekker P, Dunstan CR. Osteoprotegerin serum levels in healthy volunteers. *Bone* 1998;23:T411

Arrighi HM, Khosla S, Melton LJ, Riggs B, Bekker P, Dunstan CR. The relationship between circulating osteoprotegerin and estrogen in postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 2000;15:M344

B

Baron R. 2003. *Anatomy and Biology of Bone Matrix and Cellular Elements*. Chapter 1. General Principles of Bone Biology. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism, fifth edition, 2003. American society for bone and mineral research, Washington, DC. Pp 1-8.

Battmann A, Battmann A, Jundt G, Schulz A. Endosteal human bone cells (EBC) show age-related activity in vitro. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 1997;105:98-102.

Beamer WG, Donahue LR, Rosen CJ, Baylink DJ. Genetic variability in adult bone density among inbred strains of mice. *Bone*. 1996;18:397-403.

Bekker PJ, Holloway D, Nakanishi A, Arrighi M, Leese PT, Dunstan CR. The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women. *J Bone Miner Res*. 2001;16:348-60.

Beresford JN, Gallagher JA, Poser JW, Russell RG. Production of osteocalcin by human bone cells in vitro. Effects of 1,25(OH)₂D₃, 24,25(OH)₂D₃, parathyroid hormone, and glucocorticoids. *Metab Bone Dis Relat Res*. 1984;5:229-34.

Beresford JN, Gallagher JA, Russell RG. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and human bone-derived cells in vitro: effects on alkaline phosphatase, type I collagen and proliferation. *Endocrinology*. 1986;119:1776-85.

Berkner KL. The vitamin K-dependent carboxylase. *J Nutr*. 2000;130:1877-80.

Bilbe G, Roberts E, Birch M, Evans DB. PCR phenotyping of cytokines, growth factors and their receptors and bone matrix proteins in human osteoblast-like cell lines. *Bone*. 1996;19:437-45.

Blanch J, Perez-Edo L, Ciria M, Benito P, Del rio L, Vila J. Hip fracture threshold in osteoporotic men. *J Bone Miner Res* 1997; 12:379.

Boonen S, Broos P, Verbeke G, Aerssens J, Van Herck E, Jans I, Dequeker J, Bouillon R. Calcitropic hormones and markers of bone remodeling in age-related (type II) femoral neck osteoporosis: alterations consistent with secondary hyperparathyroidism-induced bone resorption. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 1997;52:M286-93.

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003;423:337-42.

Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C, Kelley M, Hsu H, Boyle WJ, Dunstan CR, Hu S, Lacey DL. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol*. 1999;145:527-38.

C

Ciria M, Blanch J, Perez-Edo L, Mariñoso L, Serrano S, Perez-García C, Romero A, Pros A, Benito P. Clinical, densitometrical, and histomorphometry data in masculine osteoporosis. *Bone* 1998; 23:395.

Cooper C, Campion G, Melton LJ 3rd. Hip fractures in the elderly: a world-wide projection. *Osteoporos Int.* 1992;2:285-9.

Cooper C. 2003. Epidemiology of Osteoporosis. Chapter 49. General Principles of Bone Biology. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism, fifth edition, 2003. American society for bone and mineral research, Washington, DC. Pp 307-315.

D

Darby AJ, Meunier PJ. Mean wall thickness and formation periods of trabecular bone packets in idiopathic osteoporosis. *Calcif Tissue Int.* 1981;33:199-204.

Del Río L. 2004. Densitometría ósea. Sección II. Capítulo 16. Manual práctico de: osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral. Pp 83-87

Demer L L. Boning Up (or Down) on statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21:1565-1566.

Deng HW, Li J, Li JL, Johnson M, Gong G, Davis KM, Recker RR. Change of bone mass in postmenopausal Caucasian women with and without hormone replacement therapy is associated with vitamin D receptor and estrogen receptor genotypes. *Hum Genet.* 1998;103:576-85.

DeVernejoul MC, Bielkoff çj, Herve M, Gueris J, Hott M, Modrowski D, Kuntz D, Miravet L, Ryckewaert A. Evidence for defective osteoblastic function. A role for alcohol and tobacco consumption in osteoporosis in middle-aged men. *Clin Othp Relat Res.* 1983;179:107-115.

Diaz Curiel M, Garcia JJ, Carrasco JL, Honorato J, Perez Cano R, Rapado A, Alvarez Sanz C. [Prevalence of osteoporosis assessed by densitometry in the Spanish female population] *Med Clin (Barc).* 2001;116:86-8.

E

Evans CE, Galasko CS, Ward C. Effect of donor age on the growth in vitro of cells obtained from human trabecular bone. *J Orthop Res.* 1990;8:234-7.

F

Filter J y Nolla M. Guía de buena práctica clínica y geriátrica. Osteoporosis. Capítulo 2: Fisiopatología: remodelado óseo en el anciano, 2004

Fisher JE, Rogers MJ, Halasy JM, Luckman SP, Hughes DE, Masarachia PJ, Wesolowski G, Russell RG, Rodan GA, Reszka AA.. Alendronate mechanism of action: geranylgeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption, and kinase activation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:133-8.

Fukuyama R, Fujita T, Azuma Y, Hirano A, Nakamuta H, Koida M, Komori T. Statins inhibit osteoblast migration by inhibiting Rac-Akt signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;315:636-42.

Fuller K, Wong B, Fox S, Choi Y, Chambers TJ. TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J Exp Med.* 1998;188:997-1001.

G

Gao YH, Shinki T, Yuasa T, Kataoka-Enomoto H, Komori T, Suda T, Yamaguchi A. Potential role of cbfa1, an essential transcriptional factor for osteoblast differentiation, in osteoclastogenesis: regulation of mRNA expression of osteoclast differentiation factor (ODF). *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;252:697-702.

Garnero P, Grimaux M, Seguin P, Delmas PD. Characterization of immunoreactive forms of human osteocalcin generated in vivo and in vitro. *J Bone Miner Res.* 1994;9:255-64.

Garrett IR, Mundy GR. The role of statins as potential targets for bone formation. *Arthritis Res.* 2002;4:237-40.

Grainge MJ, Coupland CA, Cliffe SJ, Chilvers CE, Hosking DJ. Association between a family history of fractures and bone mineral density in early postmenopausal women. *Bone.* 1999;24:507-12.

Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M, Snieder H, Kemp PR, Metcalfe JC, Carter ND, Spector TD. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1. *Hum Mol Genet.* 1999;8:93-7.

Gundberg CM, Clough ME. The osteocalcin propeptide is not secreted in vivo or in vitro. *J Bone Miner Res.* 1992;7:73-80.

Gutierrez G. Regulación paracrina. Sección I. Capítulo 3. Manual práctico de: osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral. 2004. Pp 13-18

H

Hakeda Y, Kobayashi Y, Yamaguchi K, Yasuda H, Tsuda E, Higashio K, Miyata T, Kumegawa M. Osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) directly inhibits bone-resorbing activity of isolated mature osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;251:796-801.

Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature.* 2003;423:349-55.

Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med.* 2001 Jun;79(5-6):243-53.

Hofbauer LC, Khosla S. Androgen effects on bone metabolism: recent progress and controversies. *Eur J Endocrinol.* 1999;140:271-86.(b)

Hofbauer LC. Osteoprotegerin ligand and osteoprotegerin: novel implications for osteoclast biology and bone metabolism. *Eur J Endocrinol.* 1999;141:195-210.(a)

Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, Tan HL, Elliott G, Kelley MJ, Sarosi I, Wang L, Xia XZ, Elliott R, Chiu L, Black T, Scully S, Capparelli C, Morony S, Shimamoto G, Bass MB, Boyle WJ. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:3540-5.

I

Ikram Z, Dulipsingh L, Prestwood KM. Lack of effect of short-term micronized progesterone on bone turnover in postmenopausal women. *J Womens Health Gend Based Med.* 1999;8:973-8.

Iturrade Navarro. Cultivo de células animales. 1983.

J

Jackson JA, Kleerekoper M, Parfitt AM, Rao DS, Villanueva AR, Frame B. Bone histomorphometry in hypogonadal and eugonadal men with spinal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987;65:53-8.

Jackson JA, Kleerekoper M. Osteoporosis in men: diagnosis, pathophysiology, and prevention. *Medicine (Baltimore).* 1990;69:137-52.

Jimi E, Akiyama S, Tsurukai T, Okahashi N, Kobayashi K, Udagawa N, Nishihara T, Takahashi N, Suda T. Osteoclast differentiation factor acts as a multifunctional regulator in murine osteoclast differentiation and function. *J Immunol.* 1999;163:434-42.

K

Karlsson MK, Johnell O, Nilsson BE, Sernbo I, Obrant KJ. Bone mineral mass in hip fracture patients. *Bone.* 1993;14:161-5.

Kartsogiannis V, Zhou H, Horwood NJ, Thomas RJ, Hards DK, Quinn JM, Niforas P, Ng KW, Martin TJ, Gillespie MT. Localization of RANKL (receptor activator of NF kappa B ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskeletal tissues. *Bone.* 1999;25:525-34.

Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis.* 2002;8:147-59.

Katzburg S, Lieberherr M, Ornoy A, Klein BY, Hendel D, Somjen D. Isolation and hormonal responsiveness of primary cultures of human bone-derived cells: gender and age differences. *Bone.* 1999;25:667-73.

Kelepouris N, Harper KD, Gannon F, Kaplan FS, Haddad JG. Severe osteoporosis in men. *Ann Intern Med.* 1995;123:452-60.

Kitazawa R, Kitazawa S, Maeda S. Promoter structure of mouse RANKL/TRANCE/OPGL/ODF gene. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1445:134-41.

Knothe Tate ML, Adamson JR, Tami AE, Bauer TW. The osteocyte. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36:1-8.

Koida M, Fukuyama R, Nakamuta H. Osteoporosis requires bone-specific statins. *Curr Pharm Des*. 2004;10:2605-13.

Kurland ES, Rosen CJ, Cosman F, McMahon D, Chan F, Shane E, Lindsay R, Dempster D, Bilezikian JP. Insulin-like growth factor-I in men with idiopathic osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82:2799-805.

Kwon BS, Wang S, Udagawa N, Haridas V, Lee ZH, Kim KK, Oh KO, Greene J, Li Y, Su J, Gentz R, Aggarwal BB, Ni J. TR1, a new member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, induces fibroblast proliferation and inhibits osteoclastogenesis and bone resorption. *FASEB J*. 1998;12:845-54.

L

Lacey DL, Tan HL, Lu J, Kaufman S, Van G, Qiu W, Rattan A, Scully S, Fletcher F, Juan T, Kelley M, Burgess TL, Boyle WJ, Polverino AJ. Osteoprotegerin ligand modulates murine osteoclast survival in vitro and in vivo. *Am J Pathol*. 2000;157:435-48.

Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998;93:165-76.

Laufs U, Marra D, Node K, Liao JK. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors attenuate Vascular smooth muscle proliferation by preventing Th α GTPase-induced Down-regulation of p27. *J Biol Chem*. 1999;274:21926-31.

Lian JB, Stain GS y Aubin E. 2003. Anatomy and Biology of Bone Matrix and Cellular Elements. Chapter 3. Bone formation: Maturation and functional activities of osteoblast lineage, fifth edition, 2003. American society for bone and mineral research, Washington, DC. Pp 13-28.

Lian JB, Stein GS, Stein JL, van Wijnen AJ. Regulated expression of the bone-specific osteocalcin gene by vitamins and hormones. *Vitam Horm.* 1999;55:443-509.

Lindsay R, Nieves J, Formica C, Henneman E, Woelfert L, Shen V, Dempster D, Cosman F. Randomised controlled study of effect of parathyroid hormone on vertebral-bone mass and fracture incidence among postmenopausal women on oestrogen with osteoporosis. *Lancet.* 1997;350:550-5.

Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP, Graham R, Russell G, Rogers MJ. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *J Bone Miner Res.* 1998;13:581-9.

M

Maeda T, Matsunuma A, Kawane T, Horiuchi N. Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;280:874-7.

Maeda T, Matsunuma A, Kurahashi I, Yanagawa T, Yoshida H, Horiuchi N. Induction of osteoblast differentiation indices by statins in MC3T3-E1 cells. *J Cell Biochem.* 2004;92:458-71.

Makhluf HA, Mueller SM, Mizuno S, Glowacki J. Age-related decline in osteoprotegerin expression by human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;268:669-72.

Malyankar UM, Scatena M, Suchland KL, Yun TJ, Clark EA, Giachelli CM. Osteoprotegerin is an alpha vbeta 3-induced, NF-kappa B-dependent survival factor for endothelial cells. *J Biol Chem.* 2000;275:20959-62.

Manolagas SC. Role of cytokines in bone resorption. *Bone.* 1995;17:63S-67S.

Marie PJ, de Vernejoul MC, Connes D, Hott M. Decreased DNA synthesis by cultured osteoblastic cells in eugonadal osteoporotic men with defective bone formation. *J Clin Invest.* 1991;88:1167-72.

Marie PJ, de Vernejoul MC. Proliferation of bone surface-derived osteoblastic cells and control of bone formation. *Bone*. 1993;14:463-8.

Marie PJ, Sabbagh A, de Vernejoul MC, Lomri A. Osteocalcin and deoxyribonucleic acid synthesis in vitro and histomorphometric indices of bone formation in postmenopausal osteoporosis. *Clin Endocrinol Metab*. 1989;69:272-9.

Masi L, Brandi ML. Physiopathological basis of bone turnover. *Q J Nucl Med*. 2001;45:2-6. Review.

Mills BG, Singer FR, Weiner LP, Holst PA. Long-term culture of cells from bone affected by Paget's disease. *Calcif Tissue Int*. 1979;29:79-87.

Miyamoto A, Kunisada T, Hemmi H, Yamane T, Yasuda H, Miyake K, Yamazaki H, Hayashi SI. Establishment and characterization of an immortal macrophage-like cell line inducible to differentiate to osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;242:703-9.

Monroe D, Spelsberg T. *Anatomy and Biology of Bone Matrix and Cellular Elements*. Chapter 5. *General Principles of Bone Biology. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*, fifth edition, 2003. American society for bone and mineral research, Washington, DC. Pp 32-37.

Montagnani A, Gonnelli S, Cepollaro C, Pacini S, Campagna MS, Franci MB, Lucani B, Gennari C. Effect of simvastatin treatment on bone mineral density and bone turnover in hypercholesterolemic postmenopausal women: a 1-year longitudinal study. *Bone*. 2003;32:427-33.

Morrison Na, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV, Sambrook PN, Eisman JA. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature*. 1994;367:216-7

Mostaza JM, De la Piedra C, Curiel MD, Pena R, Lahoz C. Pravastatin therapy increases procollagen I N-terminal propeptide (PINP), a marker of bone formation in post-menopausal women. *Clin Chim Acta*. 2001;308:133-7.

Mundy GR, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, Boyce B, Zhao M, Gutierrez G. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science*. 1999;286:1946-9.

Mundy GR. Local control of bone formation by osteoblasts. *Clin Orthop*. 1995:19-26.

Mundy GR. Local control of osteoclast function. *Osteoporos Int.* 1993; 1:126-7.

N

Nordin BE, Aaron J, Speed R, Francis RM, Makins N. Bone formation and resorption as the determinants of trabecular bone volume in normal and osteoporotic men. *Scott Med J.* 1984; 29: 171-175.

O

O'Neill TW, Felsenberg D, Varlow J, Cooper C, Kanis JA, Silman AJ. The European vertebral osteoporosis study group (EVOS). The prevalence of the European Vertebral Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res* 1996; 11: 1010-1018.

O'Brien EA, Williams JH, Marshall MJ. Osteoprotegerin ligand regulates osteoclast adherence to the bone surface in mouse calvaria. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;274:281-90.

Ohnaka K, Shimoda S, Nawata H, Shimokawa H, Kaibuchi K, Iwamoto Y, Takayanagi R. Pitavastatin enhanced BMP-2 and osteocalcin expression by inhibition of Rho-associated kinase in human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;287:337-42.

Organización Mundial de la Salud (OMS)(World Health Organization:WHO). Assessment of fracture risk and application to screening for postmenopausal osteoporosis. WHO technical report series 843. Geneva; 1994.

Oxlund H, Andreassen TT. Simvastatin given per orally to adult rats increases the compressive strength of vertebral bodies. *J Bone Miner Res.* 2000.15:S1;S549.

Oxlund H, Andreassen TT. Simvastatin treatment partially prevents ovariectomy-induced bone loss while increasing cortical bone formation. *Bone.* 2004;34:609-18.

P

Parfitt AM, Shih M-S, Rao DS, Kleerekoper M, Relationship between bone formation rate and osteoblast surface in aging and osteoporosis: evidence for impaired osteoblast recruitment in pathogenesis. *J. Bone Miner Res* 1992; 7.

Parhami F, Jackson SM, Tintut Y, Le V, Balucan JP, Territo M, Demer LL. Atherogenic diet and minimally oxidized low density lipoprotein inhibit osteogenic and promote adipogenic differentiation of marrow stromal cells. *J Bone Miner Res.* 1999;14:2067-78.

Parhami F, Morrow AD, Balucan J, Leitinger N, Watson AD, Tintut Y, Berliner JA, Demer LL. Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation. A possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:680-7.

Parhami F, Tintut Y, Beamer WG, Gharavi N, Goodman W, Demer LL. Atherogenic high-fat diet reduces bone mineralization in mice. *J Bone Miner Res.* 2001;16:182-8.

Pederson L, Kremer M, Judd J, Pascoe D, Spelsberg TC, Riggs BL, Oursler MJ. Androgens regulate bone resorption activity of isolated osteoclasts in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:505-10.

R

Raisz LG. Pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *Rev Endocr Metab Disord.* 2001;2:5-12.

Raisz LG. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin Chem.* 1999;45:1353-8. Erratum in: *Clin Chem* 1999;45:1885.

Raisz LG. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin Chem.* 1999;45:1353-8.

Raisz LG. The osteoporosis revolution. *Ann Intern Med.* 1997;126:458-62.

Ralston SH. The genetics of osteoporosis. *QJM.* 1997;90:247-51.

Recker RR, Barger-Lux MJ. Bone Biopsy and Histomorphometry in Clinical Practice. Chapter 30. General Principles of Bone Biology. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism, fifth edition, 2003. American society for bone and mineral research, Washington, DC. Pp 213-219.

Recker RR, Hinders S, Davies KM, Heaney RP, Stegman MR, Lappe JM, Kimmel DB. Correcting calcium nutritional deficiency prevents spine fractures in elderly women. *J Bone Miner Res.* 1996;11:1961-6.

Robey PG y Boskey AL. 2003. *Anatomy and Biology of Bone Matrix and Cellular Elements*. Chapter 6. Extracellular matrix and biomineralization of bone. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism, fifth edition, 2003. American society for bone and mineral research, Washington, DC. Pp 38-46.

Robey PG, Termine JD. Human bone cells in vitro. *Calcif Tissue Int.* 1985;37:453-60.

Robey PG. Collagenase-treated trabecular bone fragments: a reproducible source of cells in the osteoblastic lineage. *Calcif Tissue Int.* 1995;56 Suppl 1:S11-2.

Rodan GA, Heath JK, Yoon K, Noda M, Rodan SB. Diversity of the osteoblastic phenotype. *Ciba Found Symp.* 1988;136:78-91.

Rodan GA, Noda M. Gene expresión in osteoblastic cells. *Eukaryotic Gene Expresión*

Rodan GA, Martin TJ. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption--a hypothesis. *Calcif Tissue Int.* 1981;33(4):349-51. *Calcif Tissue Int.* 1981;33:349-51.

Roodman GD. Role of cytokines in the regulation of bone resorption. *Calcif Tissue Int.* 1993;53 Suppl 1:S94-8.

Rossert J, Terraz C, Dupont S. *Nephrol Dial Transplant.* 2000;15 Suppl 6:66-8. Regulation of type I collagen genes expression.

S

SEIOMM. *Grupo de Trabajo de la SEIOMM* (Sociedad Española de Investigaciones Óseas y Metabolismo Mineral). Osteoporosis postmenopáusica. Guía de Práctica Clínica.

Serrano S, Mariñoso ML. Bases histológicas de histomorfometría ósea. En: Serrano S, Aubia J y Mariñoso ML. *Patología Ósea Metabólica.*: eds Doyma Barcelona, 1990, 55-70.

Silverberg SJ, Shane E, Jacobs TP, Siris E, Bilezikian JP. A 10-year prospective study of primary hyperparathyroidism with or without parathyroid surgery. *N Engl J Med*. 1999;341:1249-55. Erratum in: *N Engl J Med* 2000;342:144.

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Boyle WJ, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997;89:309-19.

Song C, Guo Z, Ma Q, Chen Z, Liu Z, Jia H, Dang G. Simvastatin induces osteoblastic differentiation and inhibits adipocytic differentiation in mouse bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;308:458-62.

Staal A, Frith JC, French MH, Swartz J, Gungor T, Harrity TW, Tamasi J, Rogers MJ, Feyen JH. The ability of statins to inhibit bone resorption is directly related to their inhibitory effect on HMG-CoA reductase activity. *J Bone Miner Res*. 2003;18:88-96.

Stancu C, Sima A. Statins: mechanism of action and effects. *J Cell Mol Med*. 2001;5:378-87.

Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev*. 1999;20:345-57.

Sugiyama M, Kodama T, Konishi K, Abe K, Asami S, Oikawa S. Compactin and simvastatin, but not pravastatin, induce bone morphogenetic protein-2 in human osteosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;271:688-92.

T

Tan KB, Harrop J, Reddy M, Young P, Terrett J, Emery J, Moore G, Truneh A. Characterization of a novel TNF-like ligand and recently described TNF ligand and TNF receptor superfamily genes and their constitutive and inducible expression in hematopoietic and non-hematopoietic cells. *Gene*. 1997;204:35-46.

Tohme JF, Seibel MJ, Silverberg SJ, Robins SP, Bilezikian JP. Biochemical markers of bone metabolism. *Rheumatol*. 1991;50:133-41.

U

Udagawa N, Takahashi N, Yasuda H, Mizuno A, Itoh K, Ueno Y, Shinki T, Gillespie MT, Martin TJ, Higashio K, Suda T. Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology*. 2000;141:3478-84.

Uitterlinden AG, Burger H, Huang Q, Yue F, McGuigan FE, Grant SF, Hofman A, van Leeuwen JP, Pols HA, Ralston SH. Relation of alleles of the collagen type I α 1 gene to bone density and the risk of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *N Engl J Med*. 1998;338:1016-21.

V

Van Beek EJ, Reekers JA. Farnesyl pyrophosphate synthase is the molecular target of nitrogen-containing bisphosphonates. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 264:108-11.

W

Walker DG. Bone resorption restored in osteopetrotic mice by transplants of normal bone marrow and spleen cells. *Science*. 1975;190:784-5.

Walker DG. Control of bone resorption by hematopoietic tissue. The induction and reversal of congenital osteopetrosis in mice through use of bone marrow and splenic transplants. *J Exp Med*. 1975 ;142:651-63.

Wang X, Tokuda H, Hatakeyama D, Hirade K, Niwa M, Ito H, Kato K, Kozawa O. Mechanism of simvastatin on induction of heat shock protein in osteoblasts. *Arch Biochem Biophys*. 2003;415(1):6-13.

Wilkie D, Bowman B, Lyga A, Bagi CM, Ranges GE, Carley W. Cerivastatin increases cortical bone formation in OVX rats. *J Bone Miner Res*. 2000;15:S1;S549.

Wong BR, Josien R, Lee SY, Sauter B, Li HL, Steinman RM, Choi Y. TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J Exp Med.* 1997;186:2075-80.

Wong MM, Rao LG, Ly H, Hamilton L, Ish-Shalom S, Sturtridge W, Tong J, McBroom R, Josse RG, Murray TM. In vitro study of osteoblastic cells from patients with idiopathic osteoporosis and comparison with cells from non-osteoporotic controls. *Osteoporos Int.* 1994;4:21-31.

Y

Yang X, Karsenty G. Transcription factors in bone: developmental and pathological aspects. *Trends Mol Med.* 2002;8:340-5.

Yano K, Tsuda E, Washida N, Kobayashi F, Goto M, Harada A, Ikeda K, Higashio K, Yamada Y. Immunological characterization of circulating osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor: increased serum concentrations in postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 1999;14:518-27.

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, Sato Y, Goto M, Yamaguchi K, Kuriyama M, Kanno T, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin(OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology.* 1998;139:1329-37.

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:3597-602.(b)

Z

Zárate A. Menopausia: ¿Son los moduladores selectivos de estrógenos (SERMs) una terapia alternativa al reemplazo hormonal? *Gac Med Mex.* 2001;137:177-178

Zárate A, Hernández M, Morán C, Ángeles L. El enfoque moderno de la osteoporosis. Rev Fac Med 2003UNAM Vol46,No2.