

Fernández-Murga ML¹, Serna E², Sanz-Salvador L¹, Hervás-Lorente A¹, Portero J², Cano A^{1,3}

1 Laboratorio de Ecofisiología, Nutrición y Salud, IATA-CSIC - Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (FISABIO) - Hospital Universitario Dr. Peset - Valencia

2 Unidad Central de Investigación en Medicina-INCLIVA - Universidad de Valencia

3 Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología - Universidad de Valencia y Servicio de Obstetricia y Ginecología - Hospital Universitario Dr. Peset - Valencia

Respuesta de preosteoblastos a compuestos de estroncio o calcio: proliferación, diferenciación, mineralización y respuesta génica global

Correspondencia: María Leonor Fernández Murga - Laboratorio de Ecofisiología, Nutrición y Salud, IATA-CSIC - Hospital Universitario Dr. Peset - La Coma s/n - 46100 Paterna - Valencia (España)
Correo electrónico: malefer@uv.es

Fecha de recepción: 17/06/2013

Fecha de aceptación: 22/10/2013

Trabajo premiado por la SEIOMM en el XVII Congreso SEIOMM de La Coruña, 2011.

Resumen

Fundamento: Los mecanismos que desencadenan la osteogénesis todavía no están aclarados. El objetivo de este estudio fue valorar el papel de estroncio y calcio, aportados en distinto soporte molecular, como inductores de distintos mecanismos de estímulo osteoblástico, incluyendo proliferación, diferenciación y mineralización de células preosteoblásticas. Se investigó también la respuesta global genómica con la técnica de *microarray*.

Métodos: Se diseñó un estudio experimental con células pre-osteoblásticas murinas MC3T3-E1, que fueron estimuladas durante 3 horas y 7 días. Se realizaron estudios bioquímicos y de expresión génica del genoma de ratón (Affymetrix).

Resultados: El estroncio unido a ranelato (SrRn) fue el más potente inductor de la capacidad de mineralización, en comparación con los otros compuestos utilizados (2,55 veces respecto al control). Los estudios de expresión génica global mostraron que a las 3 horas cambian 2.030 genes de los cuales 1.644 genes son específicos de esta fase. Por el contrario, a 7 días de tratamiento sólo cambian 329 genes siendo específicos 147 genes. Los procesos biológicos más enriquecidos a las 3 horas fueron los involucrados en la regulación transcripcional (147 genes), procesos metabólicos (140 genes) y la fosforilación de proteínas (44 genes) entre otros, mientras que a 7 días hubo cambios relacionados con el ciclo celular (18 genes) y con el metabolismo de carbohidratos en general (12 genes).

Conclusión: El estroncio unido al anión ranelato se comportó como el más potente inductor de la osteogénesis comparado con otros aniones como cloruro o hidróxidos. El estímulo a 3 horas presentó mayores cambios de expresión de genes en comparación a 7 días. Los procesos biológicos afectados pueden ser útiles para especular sobre cascadas de señalización involucradas en la activación osteoblástica y sobre nuevas dianas moleculares con fines terapéuticos.

Palabras clave: osteoporosis, osteogénesis, estroncio, calcio, *microarray* de genes, expresión génica.

Response of osteoblasts to compounds of strontium or calcium: proliferation, differentiation, mineralisation and whole genome response

Summary

Background: The mechanisms which trigger osteogenesis are not yet clear. The objective of this study was to evaluate the role of strontium and calcium, provided in different molecular forms, as inductors of different mechanisms of osteoblast stimulus, including proliferation, differentiation and mineralisation of preosteoblast cells. The whole genomic response was also investigated using the microarray technique.

Methods: An experimental study was designed with murine preosteoblast cells MC3T3-E1, which were stimulated for 3 hours and 7 days. Biochemical and genome gene expression studies of mouse (Affymetrix) were carried out.

Results: Strontium bonded with ranelate (SrRn) was the most powerful inductor of the capacity of mineralisation in comparison with the other compounds used (2.55 times that of the control). The studies of whole gene expression showed that after 3 hours 2030 genes change, of which 1644 are specific to this phase. On the other hand, after 7 days of treatment only 329 genes change, of which 147 are specific. The biological processes most enriched after 3 hours are those involved in the regulation of transcription (147 genes), metabolic processes (140 genes) and protein phosphorylation (44 genes) among others, while at 7 days these are changes relating to the cell cycle (18 genes) and carbohydrate metabolism in general (12 genes).

Conclusion: Strontium bonded with the ranelate anion performed as the most powerful inductor of osteogenesis compared with other anions such as chloride or the hydroxides. The stimulation for 3 hours showed greater changes in gene expression in comparison with 7 days. The biological processes affected may be useful in speculating on the signalling cascades involved in the activation of the osteoblast, and on new molecular targets for therapeutic purposes.

Key words: osteoporosis, osteogenesis, strontium, calcium, gene microarray, gene expression.

Introducción

El esqueleto proporciona apoyo y equilibrio mineral al organismo. El tejido esquelético se forma durante el crecimiento y se mantiene durante la vida adulta por una continua renovación de la matriz ósea, a través de un proceso denominado remodelación ósea. En ella juegan un papel importante dos tipos celulares, osteoclastos y osteoblastos. Durante el crecimiento, la formación ósea excede la resorción, resultando en aportación neta. Por el contrario, durante el envejecimiento, se produce un desequilibrio que resulta en un balance óseo negativo¹. Mecanismos extrínsecos, como cambios en niveles de hormonas y factores de crecimiento, y mecanismos intrínsecos asociados a la senescencia celular, pueden condicionar las disfunciones de los osteoblastos^{2,3}. Esto conduce a un aumento del número de unidades de remodelación ósea, lo que favorece la perforación trabecular y la reducción en el hueso endocortical que conducen a una resistencia ósea reducida^{4,5}.

A fin de limitar el exceso de resorción que sigue a la menopausia, se han desarrollado una serie de fármacos anti-resortivos, tales como bisfosfonatos, anticuerpos monoclonales contra citoquinas implicadas en la diferenciación osteoclástica, inhibidores de catepsina K, etc^{6,7}. Sus efectos a largo plazo, sin embargo, son desconocidos⁷. Un reto importante en el tratamiento de la osteoporosis es la identificación de estrategias capaces de

invertir el deterioro de la formación ósea ligado a la edad. Hasta la fecha, el número de agentes anabólicos que promuevan la osteoblastogénesis es limitado. La disponibilidad de hormona paratiroidea (PTH) fue un importante avance en el tratamiento de la osteoporosis⁸. El suministro intermitente de PTH aumenta la formación ósea en pacientes con osteoporosis, lo que resulta en un aumento de la masa ósea trabecular y el espesor cortical⁸⁻¹⁰. Sin embargo, este tratamiento anabólico tiene algunas limitaciones vinculadas a la vida media baja y alto coste de esta molécula.

El estroncio (Sr), un catión cercano al calcio en la tabla periódica, ha demostrado acciones farmacológicas sobre el metabolismo óseo^{11,12}. En ciertos modelos experimentales parece desarrollar una acción anabólica, lo que ha despertado atención sobre vías asociadas capaces de promover formación ósea. En ratas ovariectomizadas (OVX), un modelo animal de osteoporosis postmenopáusica, se observó que, a corto y largo plazo, el tratamiento con Sr impidió la pérdida de hueso trabecular inducida por la deficiencia de estrógenos^{13,14}. Ensayos clínicos controlados en mujeres osteoporóticas postmenopáusicas mostraron que el tratamiento con Sr redujo el riesgo relativo de fractura vertebral en comparación con el grupo placebo¹⁵, así como el riesgo de todas las fracturas no vertebrales y fracturas de cadera, como se analiza en un subgrupo de pacientes con edad avanzada^{16,17}.

Varios mecanismos pueden explicar la disminución del riesgo de fractura inducida por el Sr en la osteoporosis. Uno de los posibles mecanismos es el aumento de la densidad mineral ósea (DMO)¹⁸; otro implicaría el efecto del Sr en la resorción y la formación ósea¹⁹. En apoyo de este hallazgo, se encontró que 12 meses de tratamiento con Sr conduce a un aumento en el número de osteoblastos, formación de la matriz y una disminución en el número de osteoclastos en pacientes con osteoporosis^{20,21}. Además de sus efectos sobre las células óseas y la microarquitectura ósea, el Sr puede aumentar la resistencia del hueso a través de cambios en las propiedades de la matriz ósea. Una fracción limitada (menos de 10%) de estroncio se incorpora en el hueso²². Por lo tanto, el efecto beneficioso del Sr en la resistencia del hueso no sólo puede resultar de sus efectos farmacológicos sobre las células de hueso, remodelación ósea y la microarquitectura, sino que también puede surgir de sus efectos sobre las propiedades de la matriz ósea; por tanto, se requieren análisis más básicos y clínicos para aclarar estos efectos a nivel molecular.

En este trabajo, hemos estudiado el efecto de diferentes compuestos de Sr y una sal de calcio (Ca) sobre distintos parámetros relacionados con la osteogénesis usando como modelo cultivos de preosteoblastos. Además, hemos realizado un estudio genómico global mediante el uso de *microarray* a fin de obtener información sobre genes y rutas de señalización implicados en la osteoformación. Para ello, hemos utilizado un *microarray* de ratón GeneChip Mouse Gene 1.0 ST, que contiene más de 750.000 sondas que representan 28.000 genes. Los genes fueron analizados a diferentes tiempos, cortos (3 horas, fase aguda) o largos (7 días, fase crónica). Los cambios en la expresión génica fueron agrupados según los procesos metabólicos más destacados y relacionados con la proliferación, diferenciación y actividad de osteoblastos.

Materiales y métodos

Cultivos celulares

Se empleó la línea celular preosteoblástica murina MC3T3-E1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.). Las células se mantuvieron en medio de cultivo compuesto por α -MEM (Invitrogen, California, EE.UU.) suplementado con 10% suero bovino fetal (SBF, Invitrogen, California, EE.UU.), 2 mM L-glutamina, 100 u/ml penicilina y 100 μ g/ml estreptomycin (Invitrogen, California, EE.UU.) en una estufa de incubación a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Para la realización de los ensayos se dejaron crecer hasta una confluencia del 60-70%.

Antes de cualquier estímulo, las células se mantuvieron durante 24 horas en medio con 2,5% de SBF. Tras este período, las células se trataron con ranelato de estroncio (SrRn, AK Scientific Inc, EE.UU.), cloruro de estroncio (SrCl₂), cloruro cálcico (CaCl₂) e hidróxido de estroncio [Sr(OH)₂] (Sigma-Aldrich) a concentración 2 mM durante los tiempos especificados en cada experimento. Los tratamientos se realizaron en medio α -MEM suplementado con 2,5% SBF, 2 mM L-glutamina, 100 u/ml penicilina y 100 μ g/ml estreptomycin. Para tratamientos prolon-

gados, el medio de cultivo se renovó en un 50% y se añadió el tratamiento correspondiente cada 3 días.

Ensayo de proliferación celular (XTT)

Las células se sembraron en una placa de 96 pocillos (densidad 4x10³ células/pocillo). Se incubaron durante 48 horas con los estímulos ya descritos. La proliferación celular se midió con el ensayo *Cell Proliferation ELISA II* (XTT-assay, Roche Applied Science, Mannheim, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras el periodo de incubación, se realizó la medida de la absorbancia a 450 y 650 nm (absorbancia de referencia) a 37°C en un lector de placas VictorTMX3 2030 Multilabel Reader (Perkin Elmer, Massachusetts, EE.UU.).

Medida de la actividad fosfatasa alcalina (ALP)

Las células MC3T3-E1 se sembraron en placas de 96 pocillos a una confluencia del 60% y se sometieron a los estímulos mencionados durante 24 horas, 3 y 7 días. Tras los tratamientos, las células se lavaron con PBS, se recogieron con Tritón X-100 0,1% PBS y se sonicaron a 4°C. Tras centrifugar a 4°C a 20.000 g durante 5 min, se recogieron los sobrenadantes en los que se determinó la actividad fosfatasa alcalina mediante el ensayo ALP Reagent (Thermo scientific, Massachusetts, EE.UU.). Se determinó la absorbancia a 405 nm y 660 nm (absorbancia de referencia) a 37°C cada min durante 10 min en un lector de placas VictorTMX3 2030 Multilabel Reader (Perkin Elmer, EE.UU.).

Se determinó la concentración de proteína mediante el método colorimétrico de Bradford (BioRad, Hemel Hempstead, Reino Unido). La actividad ALP se expresa en μ g de producto formado por minuto de reacción sobre la cantidad de proteína presente en el sobrenadante (U/mg).

Ensayos de mineralización

Para cuantificar la mineralización de los cultivos celulares se utilizó rojo alizarina (ARS, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EE.UU.), un colorante orgánico capaz de unirse a los depósitos de calcio de las células. Se emplea por tanto como marcador de la capacidad de formación de matriz calcificada. Para la realización de experimentos, las células MC3T3-E1 se sembraron en placas de 6 pocillos y se incubaron con los diferentes tratamientos SrRn, SrCl₂, CaCl₂ y Sr(OH)₂ durante 24 horas, 3 y 7 días. Luego, las células se lavaron con PBS y se fijaron con formaldehído 10% 15 min. Tras la fijación, se trataron con solución de ARS (40 mM, pH 4,2) 20 min a temperatura ambiente. Para detectar la capacidad de mineralización, las células marcadas con ARS se incubaron con ácido acético 10% durante 30 min a temperatura ambiente; posteriormente, se recogió la suspensión celular y se incubaron a 85°C durante 10 min seguido de 5 min en hielo, para recoger los sobrenadantes tras centrifugar a 20.000 g 15 min. Se añadió hidróxido potásico (KOH) 10% a cada sobrenadante y finalmente se determinó la intensidad de la fijación del ARS midiendo la absorbancia a 405 nm en un lector de placas VictorTMX3 2030 Multilabel Reader (Perkin Elmer, EE.UU.).

Extracción de ARN total

Las células se cultivaron por triplicado a una concentración de 10^6 células por muestra. Tras ello, se dividió un número igual de muestras con o sin tratamiento con 2 mM de SrRn durante 3 horas y durante 7 días. Tras estos periodos de incubación, se eliminó el medio de cultivo y se realizó la extracción de ARN total por el método de trizol siguiendo las especificaciones del fabricante (Invitrogen, California, EE.UU.). Se comprobó la cantidad y pureza obtenida determinando la absorbancia a 260 y 280 nm en Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, EE.UU.).

Microarrays de expresión génica

El análisis de la expresión global del genoma se realizó con el *microarray* GeneChip Mouse Gene 1.0 ST Array (Affymetrix, Santa Clara, California, EE.UU.) que contiene más de 750.000 sondas, con una longitud de 25 oligonucleótidos, que representan a 28.000 genes de ratón. Se obtuvo triplicados biológicos para cada condición: controles, 3 horas y 7 días de tratamiento. Se partió de 300 ng de ARN total, previamente analizando su integridad (Bioanalizador, 2100 Agilent), para sintetizar la cadena simple de ADNc. Su posterior fragmentación y marcaje se hizo siguiendo las indicaciones del fabricante (Affymetrix, Santa Clara, California, EE.UU.). La hibridación tuvo lugar durante 17 horas a 45°C en rotación a 60 rpm dentro del horno recomendado por Affymetrix "GeneChip Hybridization Oven 640" (Affymetrix, Santa Clara, California, EE.UU.). Tras este período, los *microarrays* pasaron por un tren de lavados y, finalmente, se realizó el marcaje con estreptoavidina-ficoeritrina usando "GeneChip Fluidics Station 450" (Affymetrix, Santa Clara, California, EE.UU.). Posteriormente, los *microarrays* fueron escaneados con "GeneChip Scanner 3000 7G" (Affymetrix, Santa Clara, California, EE.UU.) y se obtuvieron las imágenes de cada una de las muestras. Los controles de calidad de estas imágenes se realizaron con el programa "Affymetrix Genechip Command Console".

Análisis estadísticos de los resultados

Los archivos .CEL normalizados de las imágenes de las muestras de todos los experimentos realizados se analizaron con el *software* Partek Genomics Suite versión 6.6 (Partek Inc., St. Louis, Missouri, EE.UU.). Los *microarrays* se normalizaron mediante el algoritmo RMA. La expresión diferencial de genes fue identificada usando ANOVA mediante un análisis muy restrictivo usando False Discovery Rate $<0,05$ (FDR $<0,05$).

La expresión de los genes basales que cambian a lo largo del tiempo entre el control a 3 horas comparado con el control a los 7 días, fueron descartados del análisis para poder observar de una manera más específica los genes que cambian tras el estímulo con SrRn.

Los procesos celulares que integran a los genes significativos, tanto para la fase aguda como para la fase crónica, fueron analizados usando el *software* Pathway Studio versión 9.0, base de datos

ResNet9.0;2012Q3 (Mammal) (Ariadne Genomics, Rockville, Maryland, EE.UU.).

Los datos bioquímicos y de proliferación celular obtenidos fueron analizados con el programa GraphPad Prism versión 4 (GraphPad Software, Inc., California EE.UU.). El estudio estadístico comparativo se llevó a cabo mediante análisis de la varianza de un solo factor (ANOVA) y test de Bonferroni para las comparativas múltiples. Los datos numéricos se expresaron como media \pm desviación estándar, valor máximo y valor mínimo. El nivel de significación estadística se estableció en valores de $p<0,05$, para todas las variables analizadas.

Resultados

Efecto de diferentes sales de Sr en cultivos de preosteoblastos MC3T3-E1

Proliferación celular

La Figura 1A presenta el efecto de las diferentes sales estudiadas sobre la proliferación celular determinada por el método de XTT. Todos los estímulos indujeron proliferación celular respecto al control negativo tras 48 horas de tratamiento. El CaCl_2 indujo el mayor grado de proliferación, con un incremento de 2,13 veces, que resultó muy significativo ($p<0,001$). Todas las sales de estroncio produjeron un discreto incremento de la proliferación celular ($p<0,05$) en el tiempo estudiado respecto al control. No hubo diferencias significativas entre las sales estudiadas.

Diferenciación celular (fosfatasa alcalina y mineralización)

La ALP es un marcador de diferenciación osteoblástica temprana, un incremento de su actividad se considera indicador del aumento de actividad de los osteoblastos maduros. La Figura 1B muestra las actividades de ALP con las distintas sales durante 7 días. Se hicieron también mediciones a tiempos más cortos (24 horas y 3 días) pero no se observó incremento de la actividad ALP con ningún estímulo (datos no mostrados); por lo tanto, durante este tiempo todavía permanecen indiferenciadas. Sin embargo, la evaluación a los 7 días produjo un aumento de la actividad ALP, de forma que el estroncio como sal de cloruro o hidróxido consiguió un aumento de 4,45 que resultó ser estadísticamente muy significativo ($p<0,001$). Las sales de CaCl_2 o SrRn mostraron un aumento menor de actividad ALP, de aproximadamente 2 veces respecto al control, con significación estadística ($p<0,01$).

Puesto que es conocido que el Sr se incorpora a la matriz ósea, se evaluó el impacto de las sales de Sr y de CaCl_2 en la capacidad de mineralización de pre-osteoblastos MC3T3-E1. Similar a lo observado en los ensayos de ALP no se observó mineralización a 24 horas ni 3 días (datos no mostrados), pero el ensayo fue positivo a 7 días de estímulo (Figura 1C). El SrRn consiguió un incremento de 2,55 veces en la mineralización medida por ARS respecto al control y de 2,2 veces si comparamos con los otros compuestos de estroncio ($p<0,05$), que a su vez parecen inducir levemente la mineralización si las comparamos con el con-

trol. Las células estimuladas con el SrRn presentaron mayor capacidad de mineralización (1,7 veces más de incremento) incluso que la sal de CaCl₂ estudiada, con una fuerte tendencia estadística (p=0,06).

En conclusión, el Sr unido a ranelato indujo una leve proliferación celular, y un aumento de la actividad ALP suficiente para conseguir la máxima capacidad mineralizante de todas las sales investigadas. Con este soporte, se procedió a investigar la expresión génica mediada por esta sal.

Análisis de la expresión de genes mediante microarray

El efecto del SrRn sobre el perfil génico de células MC3T3-E1 se investigó también durante 3 horas y 7 días de estímulo. Estos tiempos de estudio se seleccionaron por estudios previos de nuestro grupo, donde detectamos los cambios más intensos de la expresión de genes relacionados con la cascada de señalización Wnt y NFAT, ambas rutas destacadas en el proceso de osteogénesis²³. Los resultados obtenidos por *microarray* fueron realizados por triplicado y se representaron en un mapa de análisis de componentes principales (PCA) (Figura 2). Se observa que las muestras de una misma condición se parecen entre sí, por eso las elipses son pequeñas. El hecho de que no se solapen las elipses nos confirma que hay diferencias génicas con las demás condiciones. Las muestras integradas dentro del estímulo de 3 horas fueron muy diferentes espacialmente en comparación con las no tratadas (control). Tras 7 días, las diferencias se redujeron, lo que sugiere que el impacto sobre la expresión génica se reduce en relación a la fase aguda.

Se realizó un análisis estadístico comparativo llevado a cabo mediante análisis de la varianza de un solo factor (ANOVA) y usando un FDR ≤0,05. Observamos que en fase aguda hay 2.030 genes que modificaron su expresión, de los cuales específicos de esta etapa son 1.644 genes que cambiaron significativamente cuando se trató a las muestras con SrRn. Por otra parte, a los 7 días de estímulo, 329 genes cambiaron de forma estadísticamente significativa, siendo específicos de la fase crónica sólo 147 genes. Los restantes genes fueron comunes a las dos fases. En este estudio se descartaron los genes que cambiaron su expresión entre los controles de 3 horas y 7 días y nos centramos en los genes que cambiaron específicamente en cada período de tiempo. En las Figuras 3A y 3B, se representan los procesos biológicos en que cabe integrar los genes con expresión diferencial. La representación se hace en función del número de genes que cambian, de mayor a menor, aunque debe subrayarse que todos los cambios presentados son estadísticamente significativos. Los procesos celulares difirieron significativamente según el tiempo de tratamiento, 3 horas o 7 días, con SrRn. En fase aguda, los

Figura 1. Efecto de diferentes compuestos de Sr en cultivos de preosteoblastos MC3T3-E1. Cultivos celulares sin estimular y tratados con CaCl₂ fueron utilizados como controles. (A) proliferación celular durante 48 h de estímulo; (B y C) actividad fosfatasa alcalina; ALP y capacidad de mineralización determinado por el método de rojo alizarina tras 7 días de tratamiento, respectivamente. Los resultados se representan como la media ± la desviación estándar de triplicados. *p<0,05, **p<0,01 ***p<0,001, comparaciones realizadas respecto al control (0)

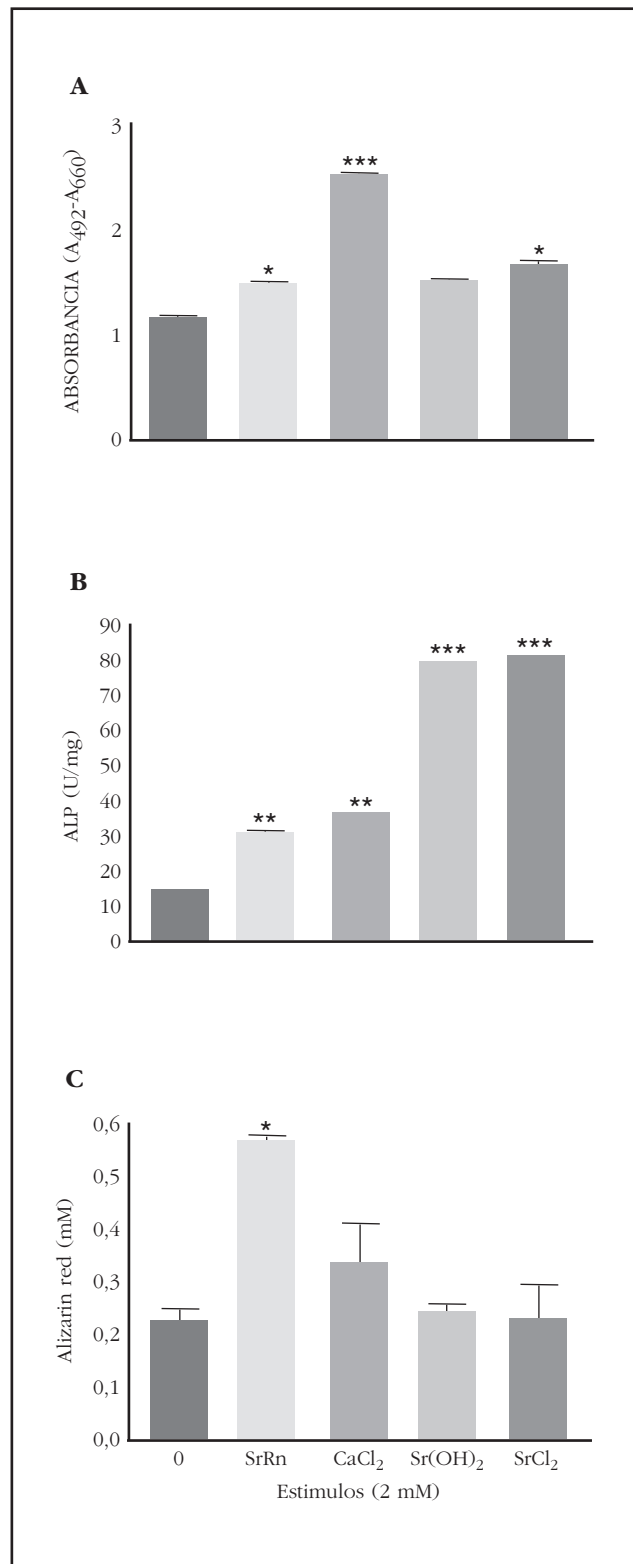
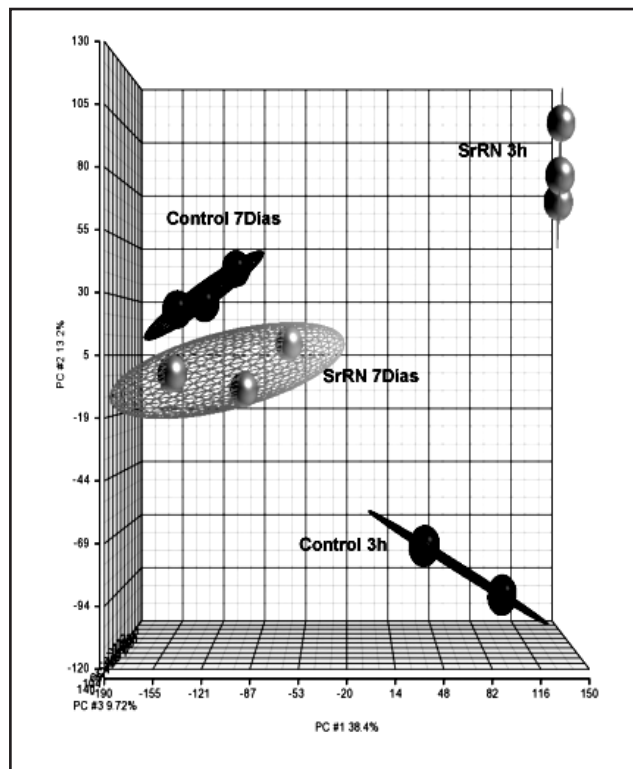


Figura 2. Representación de Mapa de Análisis de componentes principales (PCA). Todas las muestras se representan en 3D mediante un análisis no supervisado de componentes principales. Las elipses se dibujan para incluir 61,3% de los genes en cada grupo



procesos celulares asociados a los genes cuya expresión cambió correspondieron a la regulación de la transcripción (147 genes), a procesos metabólicos en general (140 genes), al transporte (89 genes, de los cuales 52 están relacionados al transporte de proteínas) y 44 genes relacionados a la fosforilación de proteínas. Por el contrario, procesos como muerte celular, reparación de DNA o respuesta al daño en DNA fueron menos enriquecidos. En cambio, a los 7 días de estímulo, fase crónica (Figura 3B), los cambios fueron diferentes y los procesos biológicos más enriquecidos fueron los metabólicos que están implicados sobre todo en el metabolismo de la glucosa (6 genes) y de los carbohidratos en general (6 genes), división y ciclo celular (10 genes), proliferación celular (6 genes) y en menor medida los relacionados con hipoxia y metabolismo de lipopolisacáridos.

Discusión

En este trabajo, hemos estudiado el efecto de tres compuestos de estroncio sobre pre-osteoblastos murinos MC3T3-E1. Hemos observado que el Sr promueve proliferación y diferenciación celular, así como mineralización, pero su potencial cambia según el anión al que esté unido. Si en el medio de cultivo está presente una fuente de fosfato orgánico, observamos zonas discretas de depósitos minerales que contienen hidroxiapatita. Entre los compuestos de estroncio estudiados, el Sr unido al ranelato (SrRn) resultó ser el más potente inductor de la mineraliza-

ción en comparación al cloruro e hidróxido de estroncio (Figura 1C). Este proceso estuvo acompañado por un discreto incremento de la actividad ALP asociado con el fenotipo de osteoblastos. Por el contrario, la mayor actividad de la fosfatasa alcalina la hemos observado con el Sr unido tanto al cloruro o hidróxido, demostrando la versatilidad de la acción del catión según el soporte molecular que le acompañe. Las células usadas en este estudio han sido muy bien caracterizadas y resultan un excelente modelo para estudios de mineralización, sin embargo, presentan una baja expresión de ALP. Se han caracterizado otros subclones de la misma línea celular que, por el contrario, presentan una elevada actividad ALP y no tienen capacidad mineralizante²⁴. Se sabe que se necesita poca actividad ALP (0,05 U/mg) para obtener fósforo inorgánico *in vitro*²⁵. En células mesenquimales de médula ósea también se han observado bajas actividades ALP y fueron capaces de mineralizar²⁶. Por lo tanto, la actividad ALP observada en las muestras estimuladas con SrRn es necesaria y suficiente para producir una matriz de mineralización.

La secuencia de la inducción de la formación de focos mineralizados progresó en un orden regulado, en los tiempos estudiados de 0-1-3-7 días. Experimentos realizados con ácido ascórbico han demostrado que este período se prolonga de 2 a 3 semanas²⁷, demostrando la eficacia de la acción del SrRn. Presumiblemente, se producen oleadas sucesivas de cambios en la expresión génica durante el período de 0-7 días requerido para la diferenciación de preosteoblastos a un fenotipo de mineralización. Nosotros hemos realizado estudios de hasta 21 días de tratamiento con los estímulos, observando que los cambios más intensos a nivel celular, como expresión de genes y activación de cascadas de señalización celular relacionadas a procesos de osteoformación, ocurren en tiempos muy cortos posterior al estímulo²⁸.

Dado el alto grado de mineralización observado, y que este proceso sólo lo pueden ejecutar osteoblastos maduros, el estroncio unido al ranelato (SrRn) nos resultó un excelente estímulo para estudiar los procesos celulares que se ponen en marcha durante la osteogénesis o formación ósea llevados a cabo por estas células.

Hemos utilizado una matriz de expresión de ratón que contiene 28.000 genes. Estudios anteriores sólo utilizaron 588 ó 8.700 sondas^{29,30}. Nuestra matriz permite investigar genes de numerosos factores de crecimiento, citoquinas, interleucinas y sus receptores, así como genes clave implicados en diferentes etapas del desarrollo embrionario. Las células MC3T3-E1 son una línea celular osteogénica clónica bien establecida, que proporciona un modelo excelente para el estudio de patrones de expresión génica en la diferenciación de osteoblastos. En nuestro estudio, el SrRn indujo en estas células un proceso de maduración que puede ser dividido en fases, lo que resulta en la formación de una matriz minerali-

zada (Figura 1C). Cada una de estas fases requiere la expresión estrechamente regulada de genes y de factores de transcripción.

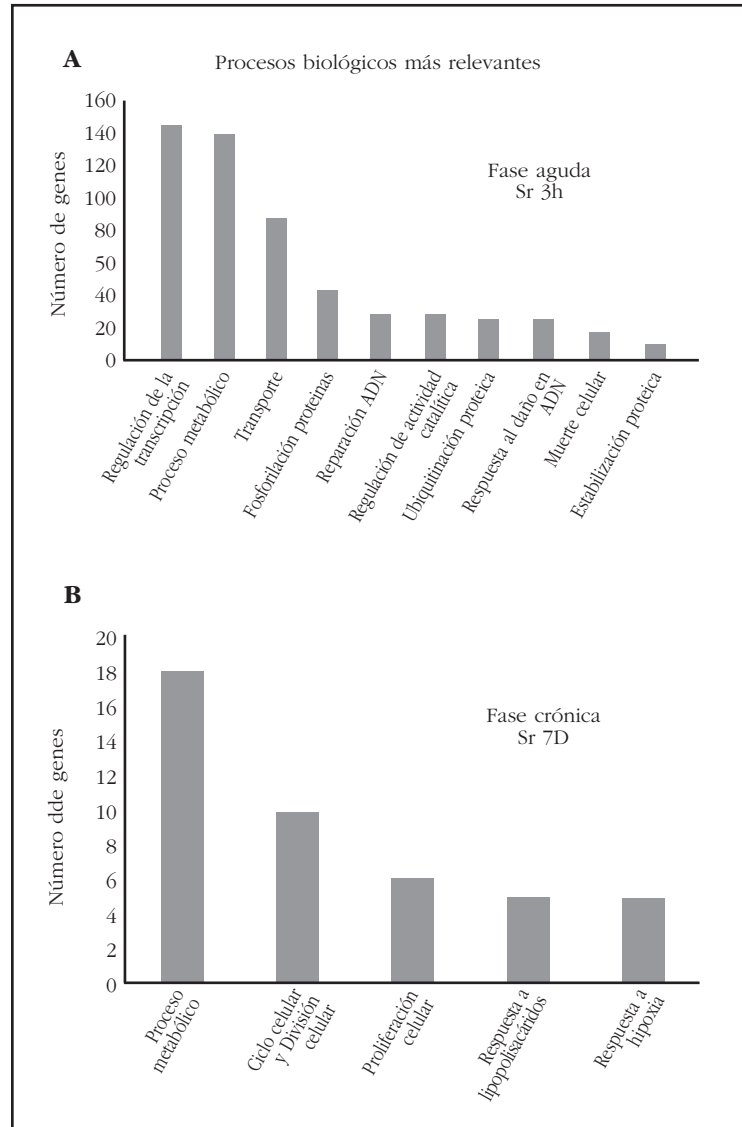
La primera fase de este proceso de maduración (3 horas del estímulo, fase aguda), se desencadenaría al tomar contacto con el estímulo, SrRn. Durante esta etapa las células MC3T3-E1 no se han diferenciado aún, y no son capaces de producir una matriz de mineralización. Sin embargo, en ellas se activa la expresión de muchos genes, hasta un total de 1.644 genes, donde los 10 procesos celulares más enriquecidos en nuestro estudio global de expresión génica se muestran en la Figura 3A. En esta etapa cambian muchos genes relacionados con la regulación de la transcripción, procesos metabólicos en general, transporte de moléculas, etc.

Destacable es que dentro de los procesos celulares enriquecidos en este corto período de tiempo está la fosforilación-desfosforilación de proteínas, un proceso que participa en un alto número de rutas celulares de gran interés. Algunas de ellas se han demostrado involucradas en la maduración de los osteoblastos, como las rutas de señalización Wnt y NFAT^{31,32}. Sin embargo, actualmente tenemos información insuficiente sobre las vías celulares que se ponen en marcha durante la diferenciación, proliferación y maduración de osteoblastos, donde sin duda los procesos de fosforilación-desfosforilación de proteínas son cruciales.

De acuerdo con este patrón, en un trabajo previo hemos confirmado que las vías Wnt/ β -catenina y NFAT, ambas potentes osteoprogenitoras, se activan a sólo 15 min de estímulo con SrRn, lo que induce cambios de expresión de genes en tiempos cortos. Por el contrario, cultivos de 21 días no muestran activación de estas vías (Datos no mostrados).

Una vez conseguida la confluencia, y coexistiendo con aumento de actividad ALP y depósito de matriz mineralizada (Figuras 1B y 1C), las células entran en una fase conocida como de diferenciación (7 días). Ésta se caracteriza por un aumento en la formación de la matriz ósea, y se asocia con el cambio de expresión de 147 genes. Los procesos celulares que están aumentados en esta fase son los relacionados con el estado energético de la célula: metabolismo de carbohidratos en general, proceso metabólico de la glucosa y otros carbohidratos, respuesta a lipopolisacáridos o gluconeogénesis. Esto convierte a esta línea celular en un modelo excelente para el estudio de los

Figura 3. Representación de los procesos biológicos de cada fase más significativos en los cuales se integran los genes modulados por el tratamiento. La representación se hace de mayor a menor cantidad de genes que cambian. Todos son estadísticamente significativos ($p < 0,001$)



eventos moleculares implicados en el proceso de osteogénesis. Los *microarrays* permiten la monitorización simultánea de un gran número de genes asociados con el metabolismo del hueso, lo que permite detectar dianas potenciales con fines terapéuticos o diagnósticos.

El uso de *microarrays* es cada vez más accesible y los datos generados a partir de este tipo de enfoque son en gran parte descriptivos. Sin embargo, la información general que se obtiene es una línea de base muy útil para estudios más analíticos de las rutas funcionales que participan durante la diferenciación celular, evento que está mediado por receptores, factores de transcripción, proteínas, enzimas, etc, que son a su vez regulados por cambios en la expresión génica.

El análisis aquí presentado ofrece una imagen dinámica de estos eventos durante la diferenciación

de osteoblastos. Los resultados de la matriz de expresión que aquí se presentan complementan estudios previos^{29,30}. Sin embargo, muchos genes estudiados previamente en osteoblastos se analizaron bajo diferentes condiciones, diferentes líneas celulares, o bajo inducción con otros agentes. La capacidad de comparar los datos recogidos en cientos de genes bajo un conjunto de condiciones con los datos de otros sistemas fortalece nuestra comprensión general de la base molecular de la osteogénesis. Estos datos son valiosos no sólo para una mejor comprensión de la osteogénesis, sino también para las comparaciones con otros tipos de tejidos. Esta información debería ayudar en el desarrollo de tratamientos más eficaces para trastornos óseos y predecir los efectos secundarios sobre el metabolismo óseo de drogas que se dirigen a los mismos factores de intervención en otras enfermedades.

Bibliografía

- Khosla S, Riggs BL. Pathophysiology of age-related bone loss and osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2005;34:1015-30.
- Flynn JM, Spusta SC, Rosen CJ, Melov S. Single cell gene expression profiling of cortical osteoblast lineage cells. *Bone* 2013;53:174-81.
- Khosla S, Oursler MJ, Monroe DG. Estrogen and the skeleton. *Trends Endocrinol Metab* 2012;23:576-81.
- Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest* 2005;115:3318-25.
- Martin TJ, Seeman E. Bone remodelling: its local regulation and the emergence of bone fragility. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008;22:701-22.
- Riggs BL, Parfitt AM. Drugs used to treat osteoporosis: the critical need for a uniform nomenclature based on their action on bone remodeling. *J Bone Miner Res* 2005;20:177-84.
- Baron R. Osteoporosis therapy-dawn of the post-bisphosphonate era. *Nat Rev Endocrinol* 2011;8:76-8.
- Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JH, et al. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 2001;344:1434-41.
- Zhang L, Yang M, Liu D, Guo C, Li L, Yang G. The rhPTH (1-34), but not elcatonin, increases bone anabolic efficacy in postmenopausal women with osteoporosis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2012;120:361-6.
- Yu EW, Neer RM, Lee H, Wyland JJ, de la Paz AV, Davis MC, et al. Time-dependent changes in skeletal response to teriparatide: escalating vs. constant dose teriparatide (PTH 1-34) in osteoporotic women. *Bone* 2011;48:713-9.
- Dahl SG, Allain P, Marie PJ, Mauras Y, Boivin G, Ammann P. Incorporation and distribution of strontium in bone. *Bone* 2001;28:446-53.
- Marie PJ. The calcium-sensing receptor in bone cells: a potential therapeutic target in osteoporosis. *Bone* 2010;46:571-6.
- Marie PJ, Hott M, Modrowski D, De Pollak, Guillemain, Deloffre P, et al. An uncoupling agent containing strontium prevents bone loss by depressing bone resorption and maintaining bone formation in estrogen-deficient rats. *J Bone Miner Res* 1993;8:607-15.
- Ammann P, Badoud I, Barraud S, Dayer R, Rizzoli R. Strontium ranelate treatment improves trabecular and cortical intrinsic bone tissue quality, a determinant of bone strength. *J Bone Miner Res* 2007;22:1419-25.
- Meunier PJ, Roux C, Seeman E, Ortolani JE, Badurski S, Spector TD, et al. The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 2004;350:459-68.
- Reginster JY, Kaufman JM, Goemaere S, Devogelaer JP, Benhamou CL, Felsenberg D, et al. Maintenance of antifracture efficacy over 10 years with strontium ranelate in postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int* 2012;23:1115-22.
- Reginster JY, Seeman E, De Vernejoul MC, Adami S, Compston J, Phenekos C, et al. Strontium ranelate reduces the risk of nonvertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: Treatment of Peripheral Osteoporosis (TROPOS) study. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:2816-22.
- Bruyere O, Roux C, Detilleux J, Slosman DO, Spector TD, Fardellone P, et al. Relationship between bone mineral density changes and fracture risk reduction in patients treated with strontium ranelate. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:3076-81.
- Bruyere O, Collette J, Rizzoli R, Decock C, Ortolani S, Cormier C, et al. Relationship between 3-month changes in biochemical markers of bone remodelling and changes in bone mineral density and fracture incidence in patients treated with strontium ranelate for 3 years. *Osteoporos Int* 2010;21:1031-6.
- Busse B, Jobke B, Hahn M, Priemel M, Niecke M, Seitz S, et al. Effects of strontium ranelate administration on bisphosphonate-altered hydroxyapatite: matrix incorporation of strontium is accompanied by changes in mineralization and microstructure. *Acta Biomater* 2010;6:4513-21.
- Braux J, Velard F, Guillaume C, Bouthors S, Jallot E, Nedelec JM, et al. A new insight into the dissociating effect of strontium on bone resorption and formation. *Acta Biomater* 2011;7:2593-603.
- Boivin G, Deloffre P, Perrat B, Panczer G, Boudeulle M, Mauras Y, et al. Strontium distribution and interactions with bone mineral in monkey iliac bone after strontium salt (S 12911) administration. *J Bone Miner Res* 1996;11:1302-11.
- Fernández-Murga Chavanne ML, Noguera R, Rubio E, García Pérez MA, Aliaga R, Cano Sánchez A. Las cascadas de señalización Wnt y su implicación en la osteogénesis. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2012;4:13.
- Wang D, Christensen K, Chawala K, Xiao G, Krebsbach P, Franceschi R. Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralization potential. *J Bone Miner Res* 1999;893-903.
- Bellows CG, Heersche JNM, Aubin JE. Inorganic phosphate added exogenously or released from beta-glycerophosphate initiates mineralization of osteoid nodules in vitro. *Bone Miner* 1992;17:15-29.
- Hoemann CD, Gabalaway H, McKee MD. In vitro osteogenesis assays: Influence of the primary cell source on alkaline phosphate activity and mineralization. *Pathol Biol* 2009;57:318-23.
- Quarles, D Yohay DA, Lever LW, Caton R, Wenstrup RJ. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. *J Cell Biol* 1992;96:683-92.
- Fernández-Murga L, Rubio E, Calap E, Aliaga RM, García Pérez MA, Cano Sánchez A. Estudios in vitro de sales de estroncio sobre la osteogénesis y su efecto en la vía de señalización Wnt/914 β-catenina. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2011;3:9.
- Beck GR, Zerler B, Moran E. Gene array analysis of osteoblast differentiation. *Cell Growth Differ* 2001;12:61-83.
- Raouf A. and Seth A. Discovery of Osteoblast-associated genes using cDNA microarrays. *Bone* 2002;30:463-71.
- Fromigué O, Hay E, Barbara A, Marie PJ. Essential role of nuclear factor of activated T cells (NFAT)-mediated Wnt signaling in osteoblast differentiation induced by strontium ranelate. *J Biol Chem* 2010;285:25251-8.
- Rybchyn MS, Slater M, Conigrave AD, Mason RS. An Akt-dependent increase in canonical Wnt signaling and a decrease in sclerostin protein levels are involved in strontium ranelate-induced osteogenic effects in human osteoblasts. *J Biol Chem* 2011;286:23771-92.