



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

*“PATRONES DE METILACIÓN DE LOS
GENES SFRP1, SFRP2, SFRP4 Y SFRP5
DURANTE EL DESARROLLO DEL
OSTEOBLASTO”*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:

KARINA LIZBET ALBARRÁN CASILDO

ASESORES:

DR. RAFAEL VELÁZQUEZ CRUZ
M.C. NYDIA BERENICE GONZÁLEZ ÁNGELES

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán



Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Patrones de metilación de los genes SFRP1, SFRP2, SFRP4 y SFRP5 durante el desarrollo del osteoblasto.

Que presenta la pasante: Karina Lizbet Albarrán Casildo
Con número de cuenta: 307002688 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 06 de Abril de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Ma. Esther Revuelta Miranda	
VOCAL	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
SECRETARIO	M. en C. Nydia Berenice González Angeles	
1er. SUPLENTE	QFB. Luis Alberto Parra Oaxaca	
2do. SUPLENTE	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*

AGRADECIMIENTOS

A mi madre Olga Albarrán que toda la vida me ha impulsado a salir adelante, proporcionándome las herramientas necesarias para enfrentar cada reto que la vida me impone sacrificando en muchas ocasiones su bienestar propio por el mío, por enseñarme que la base de todo éxito está formada de trabajo, entereza, sacrificios y mucho coraje para salir adelante; por el simple hecho de darme la vida, amarme y darme el privilegio de ser su hija aún en contra de todas las consecuencias y cambios que podía sufrir su destino.

A mi familia que desde que llegué a este mundo me amaron y me arroparon con la calidez que solo ellos saben dar. Por apoyarme en este camino largo y un tanto complejo, especialmente a mi papá Esteban Hernández por darme ese amor desinteresado a pesar de no compartir la misma sangre; a mi tía Antonieta Albarrán que ha sido como una segunda madre para mí y para mi hermano, que nos ha apoyado en todo momento como nadie lo ha hecho; a mi hermano Esteban, que a pesar de tener tantas diferencias hemos estado juntos en todo momento y mejor hermano no pude haber tenido; a mi hermano Jesús que comparte los mismos anhelos que yo; a mi tía Ma. Angélica Albarrán por apoyarme y animarme cuando me sentía frustrada de no lograr lo que me proponía y a mi tío Héctor Albarrán por estar al pendiente, por quererme y siempre brindarme una sonrisa aunque se sintiera triste y tuviera un día difícil. A cada uno de ellos les agradezco infinitamente que han sido los únicos que creen ciegamente que puedo lograr cuanto me proponga y desean que cumpla cada una de mis metas, pero principalmente, por no permitir que desistiera de tan pesado objetivo a pesar de tantos obstáculos que se presentaron.

A Leonardo Quezada, mi novio, el amor de mi vida y mi mayor soporte. Gracias por no dejarme caer en los momentos más complicados y más desesperantes, por siempre apoyarme y hacerme feliz, por llegar en el momento preciso y hacerme fuerte en todos los momentos de flaqueza que se presentarían.

A mi mejor amiga y hermana Paola Flores, por tanto apoyo en esta etapa y tantos años de amistad, por ser mi confidente y siempre darme el mejor consejo y escucharme en todo momento que lo necesito.

A mis amigos Jhovani y Berenice por su sincera amistad, por su apoyo en lo difícil que fue realizar este proyecto y por hacer mis días agradables en el INMEGEN a pesar de lo difícil que podía ser, por ayudarme a aclarar mis dudas en la realización de este proyecto.

A mi asesora la M.C. Nydia Berenice González Ángeles por apoyarme en todo momento y por tenerme paciencia.

Finalmente agradezco al Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) por permitirme realizar mi proyecto de tesis en sus instalaciones en el Laboratorio de Genómica del Metabolismo Óseo.

El presente proyecto fue realizado en:



En el Laboratorio de Genómica del Metabolismo Óseo a cargo del Dr. Rafael Velázquez Cruz

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
ÍNDICE DE TABLAS	8
ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN.....	12
INTRODUCCIÓN.....	14
1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	15
1.1 TEJIDO ÓSEO.....	15
1.1.1 GENERALIDADES DEL TEJIDO ÓSEO	15
1.1.2 REMODELADO ÓSEO	16
1.2 EL OSTEOLASTO.....	20
1.2.1 DIFERENCIACIÓN DEL OSTEOLASTO	21
1.3 MECANISMOS EPIGENÉTICOS.....	23
1.3.1 METILACIÓN DEL DNA.....	23
1.3.2 MECANISMO BÁSICO DE LA METILACIÓN DEL DNA	28
1.4 VIA DE SEÑALIZACIÓN Wnt.....	35
1.4.1 VÍA DE SEÑALIZACIÓN Wnt β -catenina (CANÓNICA)	38
1.4.2 VIA DE SEÑALIZACIÓN Wnt β -catenina Y SU PARTICIPACIÓN EN EL METABOLISMO OSEO Y EN LA DIFERENCIACIÓN DEL OSTEOLASTO.....	40
1.5 FAMILIA DE PROTEÍNAS SECRETADAS RELACIONADAS CON FRIZZLED (SFRPs).....	43
1.5.1 ESTRUCTURA Y FUNCIONES DE LAS PROTEÍNAS SFRP.....	44
1.5.2 IMPACTO DE LA FAMILIA SFRP EN EL TEJIDO ÓSEO	47
1.5.3 REPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL POR HIPERMETILACIÓN DE LOS GENES SFRP	47
2. OBJETIVOS	50
2.1 OBJETIVO GENERAL	50
2.2 OBJETIVOS PARTICULARES	50
3. HIPÓTESIS	51
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	52
4.1 EXPERIMENTACIÓN	52
4.1.1 CULTIVO CELULAR.....	53
4.1.2 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	53

4.1.3 EXPRESIÓN DE LOS GENES SFRP (SFRP1, SFRP2, SFRP4 Y SFRP5) EN LAS TRES LÍNEAS OSTEABLÁSTICAS.....	55
4.1.4 EVALUACIÓN DEL ESTADO DE METILACIÓN DE LOS PROMOTORES DE LOS GENES SFRP1, SFRP2, SFRP4 Y SFRP5	55
5. RESULTADOS	57
5.1 GEN SFRP1	57
5.1.1 EXPRESIÓN RELATIVA DE SFRP1.....	57
5.1.2 METILACIÓN DE SFRP1.....	58
5.2 GEN SFRP2	59
5.2.1 EXPRESIÓN RELATIVA DE SFRP2.....	59
5.2.2 METILACIÓN SFRP2	59
5.3 GEN SFRP4	60
5.3.1 EXPRESIÓN RELATIVA DE SFRP4.....	60
5.3.2 METILACIÓN DE SFRP4.....	61
5.4 GEN SFRP5	63
5.4.1 EXPRESIÓN RELATIVA DE SFRP5.....	63
5.4.2 METILACIÓN DE SFRP5.....	63
6. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	65
6.1 SFRP 1: EXPRESIÓN Y METILACIÓN.....	65
6.2 SFRP2: EXPRESIÓN Y METILACIÓN.....	68
6.3 SFRP4: EXPRESIÓN Y METILACIÓN.....	69
6.4 SFRP5: EXPRESIÓN Y METILACIÓN.....	70
7. CONCLUSIONES	72
8. REFERENCIAS	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Modelo de Remodelado Óseo.....	19
Figura 2.- Cultivo celular de Osteoblastos	20
Figura 3.- Metilación del DNA	25
Figura 4.- Principales formas y distribución de la metilación del DNA.....	27
Figura 5.- Enzimas que intervienen en la metilación del DNA	28
Figura 6.- Vías de desmetilación activa.....	32
Figura 7.- Maquinaria de Secreción de ligandos Wnt.....	36
Figura 8.- Visión general de las diferentes vías de señalización Wnt	37
Figura 9.- Vía de señalización Wnt canónica (estado “ON”).....	40
Figura 10.- Wnt en la diferenciación del osteoblasto.....	42
Figura 11.- Papel ejercido por la Vía Wnt canónica en la diferenciación del Osteoblasto.....	42
Figura 12.- SFRPs mediadores inhibitorios de Wnt.....	45
Figura 13.- Hipermetilación de los genes SFRP.....	48
Figura 14.- Diagrama de estrategia experimental del protocolo a seguir	52
Figura 15.- Expresión relativa del gen SFRP1 en las tres líneas celulares osteoblásticas.	57
Figura 16.- Estado de metilación del gen SFRP1.	58
Figura 17.- Expresión relativa del gen SFRP2 en las tres líneas celulares osteoblásticas	59
Figura 18.- Estado de metilación del gen SFRP2.....	60
Figura 19.- Expresión relativa del gen SFRP4 en las tres líneas celulares osteoblásticas ...	61
Figura 20.- Estado de metilación del gen SFRP4.....	62
Figura 21.- Estado de metilación del gen SFRP5.....	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Cuadro comparativo entre los genes de la familia SFRP	43
Tabla 2.- Cuadro comparativo de la familia de proteínas SFRP	46
Tabla 3.- Características y condiciones de cultivo de cada una de las líneas celulares utilizadas en el proyecto	54
Tabla 4.- Condiciones establecidas para MSP	56
Tabla 5.- Expresión Relativa de los genes SFRP en las tres líneas celulares osteoblásticas.....	64
Tabla 6.- Estado de metilación del promotor de los genes SFRP en las tres líneas celulares osteoblásticas	64

ABREVIATURAS

aa: aminoácidos

AID/APOBEC: Citidina Diaminasa inducida por activación/ Complejo enzimático editor de la apolipoproteína B

AMMOM: Asociación Mexicana de Metabolismo Óseo y Mineral

APC: Poliposis Coli Adenomatosa

ATCC®: American Type Culture Collection

BER: Reparación por Escisión de Base

BMP: Proteína Morfogénica Ósea

BMU: Unidad Básica Multicelular

bp: Pares de bases

BRC: Compartimento de Remodelado Óseo

β -TrCP: Proteína con repeticiones β -transducina

C-: Control negativo

C+: Control positivo

CGI: Islas CG

CK1: Caseína 1

CRD: Dominio Rico en Cisteína

CRO: Células de Recubrimiento Óseo

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DNMT (DNMT1, DNMT3a, DNMT3b): DNA metiltransferasa

$\Delta\Delta$ Ct: Doble delta Ct

ER: Expresión Relativa

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

Fz: Frizzled

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GMP: Guanosín Mono fosfato

GSK-3 β : Glucógeno sintasa 3 β

hMSC: Células mesenquimales humanas

IGF: Factor de crecimiento insulínico

JNK: Cinasa Jun N-terminal

Lef: Factor de unión estimulador linfoide

LRP (LRP5, LRP6): Correceptor lipoproteico de baja densidad

MBD: Dominio de unión a metil CpG

M-CSF: Factor Estimulante de Colonias de Monocitos/Macrófagos

MeCP (MeCP2): Proteínas de Unión a Metil Citosinas

MF/MR (oligos): Metilado Forward/Metilado Reverse

miRNA: micro RNA

MSC: Células Mesenquimales

MSP: PCR de metilación específica

NF-AT: Factor Nuclear de Linfocito T activado

NF- κ B: Factor Nuclear κ B

NTR: Dominio relacionado con Netrina

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PKC: Proteín Cinasa C

Prcn: Porcupina

PTH: Hormona Paratiroidea (Paratohormona)

RANKL: Ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B

RE: Retículo Endoplásmico

RER: Retículo Endoplásmico Rugoso

RNA: Ácido Ribonucleico

RNAi: RNA de interferencia

RNAm: RNA mensajero

RO: Remodelado Óseo

RT: Retrotranscripción

SAM: S-adenosil metionina

SARP: Proteínas Secretadas Relacionadas con Procesos de Apoptosis

SFRP: Proteína Secretada Relacionada con Frizzled

Tcf: Factor de transcripción específico de células T

TDG: Timina DNA glicosilasa

Tet: Enzimas de translocación ten-eleven

Thy: Timina

TRD: Dominio de represión transcripcional

UF/UR (oligos): No metilado Forward/ No metilado Reverse

UHRFVEGF: Factor de Crecimiento Vascular Endotelial

Wnt: Wntless

5-aza-dCyd: 5'-aza-2deoxi-azacitidina

5caC: 5-carboxi-citidina

5fC: 5-formil-citosina

5hmC: 5-hidroximetil-citosina

5mC: 5-metil-citosina

5hmU: 5-hidroximetil-uracilo

RESUMEN

Es necesario entender el funcionamiento e importancia de uno de los tejidos más dinámicos del organismo que provee movilidad, protección de órganos vitales y metabolismo de una reserva importante de iones, sin mayor preámbulo se trata del tejido óseo. Dicho tejido por naturaleza se somete a un proceso de mantenimiento conocido como remodelado óseo en el cual principalmente se encuentran involucradas dos células protagonistas; los osteoclastos, encargados de la remoción de hueso dañado y los osteoblastos, los responsables de la formación de hueso nuevo en las zonas en las que los osteoclastos removieron tejido.

Para que los osteoblastos realicen su función de forma óptima, deben tener un proceso de diferenciación adecuado, desde que provienen de las células mesenquimales hasta su total maduración, sin embargo, esto depende en mayor medida de una vía de señalización involucrada en el desarrollo, diferenciación y maduración de estas células, la vía de señalización Wnt. Ésta vía de señalización puede ser interrumpida por una familia de genes llamados SFRP, llevando a un desarrollo inadecuado de la célula, trayendo como consecuencia patologías en el tejido óseo, la principal de ellas es la osteoporosis, enfermedad responsable de un riesgo alto de fractura de huesos. Sin embargo existen mecanismos epigenéticos que pueden tener injerencia en el silenciamiento de genes, para con ello regular la expresión de los mismos. Uno de los mecanismos epigenéticos más estudiados es la metilación del DNA, que consiste en la adición de un grupo metilo a citosinas situadas en los pares CpG.

En el presente proyecto, se determinó el estado de metilación de los genes SFRP1, SFRP2, SFRP4 y SFRP5 en células osteoblásticas con la finalidad de determinar si la metilación es uno de los mecanismos epigenéticos encargados de regular dichos genes durante el desarrollo del osteoblasto.

Al determinar el estado de metilación en la región promotora de los genes SFRP1, SFRP2, SFRP4 y SFRP5 en tres líneas celulares osteoblásticas de humano MG-63, Saos-2 y hFOB 1.19, las dos primeras provenientes de osteosarcoma y la tercer línea mencionada, de origen fetal; quedó de manifiesto que los genes SFRP1, SFRP2 y SFRP5 presentan patrones de metilación en las tres líneas celulares; caso contrario del gen SFRP4, que únicamente la metilación se observa en la línea celular hFOB 1.19. Al analizar los resultados de expresión de estos genes en las líneas celulares empleadas se demostró que la metilación tiene un papel importante en el gen SFRP1, ya que en la línea celular hFOB 1.19 la expresión del gen aumentó en medida que la metilación disminuía en el transcurso del tiempo de cultivo y, en el caso del gen SFRP5 no se expresó en ninguna de las tres líneas celulares, sin

embargo, eso no significa que fuera regulado en el tejido óseo, sino que el gen SFRP5 no tiene incidencia en este tejido, sustentado en literatura previamente publicada. Los genes SFRP2 y SFRP4 a pesar de presentar un estado de metilación en las tres líneas celulares, quedó demostrado que la metilación no es un mecanismo que los regule, ya que los resultados de expresión fueron positivos para estos dos genes en las tres líneas celulares a pesar de la metilación observada.

INTRODUCCIÓN

El tejido óseo provee funciones de gran importancia para nuestra supervivencia a lo largo de nuestra vida. Es importante enfatizar que para su buen funcionamiento debe estar en un constante proceso de mantenimiento, el cual se encuentra orquestado por dos células importantes: el osteoclasto, que es el responsable de realizar la remoción del hueso dañado para que consecuentemente el osteoblasto, la segunda célula principalmente involucrada, lleve a cabo la creación de hueso nuevo en la zona que ha sido removida de daños, este proceso perfectamente coordinado lleva por nombre “Remodelado Óseo”. Sin embargo, también puede ser alterado negativamente trayendo como consecuencia procesos patológicos como lo es la osteoporosis, la cual según datos de la Asociación Mexicana de Metabolismo Óseo y Mineral (AMMOM) tiene una recurrencia del 18% en mujeres y 8% en varones mayores de 50 años, lo que conlleva a un riesgo elevado de fractura en las personas de mayor edad en nuestra población (AMMOM, 2016). Una de las principales razones se debe a un desarrollo erróneo del osteoblasto y por consiguiente una inadecuada diferenciación.

La vía de señalización Wnt es una de las principales vías involucradas durante el desarrollo, diferenciación y maduración de múltiples células, entre ellas el osteoblasto. Sin embargo, dicha vía está en una constante exposición a ser interrumpida por distintos antagonistas, como lo son los SFRP, los cuales tienen la capacidad de unirse directamente a receptores de Wnt o secuestrar ligandos Wnt y de esta manera impedir el desarrollo de ésta vía.

Uno de los principales procesos epigenéticos que juega un papel importante durante la transcripción y expresión génica es la metilación del DNA, la cual promueve el silenciamiento del gen en cuestión. En diversas publicaciones se ha reportado que los genes SFRP se encuentran metilados en diferentes tipos de cáncer tales como de próstata, colon y mama, por mencionar a algunos.

Lo pretendido en este proyecto es estudiar si los genes SFRP presentan patrones de metilación en sus regiones promotoras y de esta manera saber si la metilación juega un papel importante en la regulación de estos genes durante el desarrollo del osteoblasto con la finalidad de conocer el impacto de la expresión o el silenciamiento de los mismos y así pueda ser una aportación que sirva como un referente para el futuro que ayude a dilucidar un poco más el proceso patológico de la osteoporosis, una de las principales enfermedades del tejido óseo.

1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1 TEJIDO ÓSEO

1.1.1 GENERALIDADES DEL TEJIDO ÓSEO

El tejido óseo es una forma especializada de tejido conjuntivo, como otros tejidos de esta naturaleza, está compuesto por células y matriz extracelular. La característica que distingue al tejido óseo de otros tejidos conjuntivos es la mineralización de su matriz, que proporciona un tejido muy duro que se caracteriza por su rigidez y su gran resistencia tanto a la tracción, como a la compresión (Ross, 2007).

El tejido óseo al ser un tejido con gran dinamismo se encuentra muy bien irrigado, sufre un recambio notable de sustancias y se remodela en forma continua, todo esto con la finalidad de desempeñar tres funciones de vital importancia para el organismo:

- a) Biomecánica: provee soporte, articulación y lugar de inserción muscular y ligamentosa
- b) Protectora: a órganos vitales, sistema nervioso central y médula ósea
- c) Metabólica: la mayor reserva de iones tales como calcio y fosfato
(Feng & McDonald, 2011)

Los huesos son los órganos del sistema esquelético y estructuralmente se componen de tejido óseo además de otros tejidos conjuntivos incluidos el tejido hematopoyético y el tejido adiposo, junto con vasos sanguíneos y nervios. La capacidad del hueso de desempeñar su función esquelética se debe al tejido óseo (Ross, 2007).

Existen dos tipos de hueso:

- 1) Hueso cortical: el cual provee las funciones mecánica y protectora
- 2) Hueso trabecular: proporciona fuerza y lleva a cabo la función metabólica
(Feng & McDonald, 2011)

La composición y la estructura de los huesos están sujetas a influencias hormonales, metabólicas y nutricionales múltiples. En principio, el hueso es un material compuesto por dos fases: una fase mineral dura y una fase de matriz orgánica, ambas estrechamente relacionadas. Este material es ideal para soportar cargas mecánicas (Welsch & Sobotta, 2008).

El hueso, al ser un tejido conjuntivo altamente especializado, consiste esencialmente en una matriz extracelular mineralizada y células especializadas: osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. El principal componente orgánico de la matriz es el colágeno tipo I, el restante, lo componen una serie de proteínas no estructurales de menor tamaño, entre las que se encuentran osteocalcina, osteonectina, algunas fosfoproteínas, sialoproteínas, factores de crecimiento y proteínas séricas. La fase inorgánica está compuesta por minúsculos cristales de un mineral de carácter alcalino, la hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. Estos cristales se incrustan entre las fibras de colágeno para formar material que reúne las características adecuadas de rigidez, flexibilidad y resistencia (Riancho & González, 2004).

La composición del hueso en términos de porcentajes queda de la siguiente manera:

- 10% composición celular
- 60% cristales minerales (hidroxiapatita)
- 30% de matriz orgánica: ésta a su vez se encuentra compuesta principalmente por colágeno tipo I (88%), otras proteínas (10%), lípidos y glicosaminoglicanos (1-2%)
(Feng & McDonald, 2011)

1.1.2 REMODELADO ÓSEO

El hueso es un tejido de origen conjuntivo enormemente dinámico, que desempeña primariamente una labor de sostén y de manera secundaria, una labor metabólica. Ambas funciones son posibles gracias a un proceso de continuo recambio esquelético conocido como Remodelado Óseo (RO) (Sociedad Española de Reumatología, 2010).

El hueso cuenta con dos tipos diferentes de células: osteoblastos o “células formadoras de hueso” y osteoclastos o “células resorbedoras” de hueso (Sociedad Española de Reumatología, 2010).

El RO se basa principalmente, en la acción concertada de poblaciones celulares que llevan a cabo las actividades de resorción y formación ósea, es decir, a medida que se va removiendo el hueso viejo éste va siendo reemplazando por hueso nuevo, asegurando la integridad del esqueleto. Esta secuencia de eventos tiene que estar altamente regulada tanto por factores locales como sistémicos, ya que si existe alguna desviación significativa en el balance neutral entre las acciones de resorción y formación, pueden traer como resultado una pérdida severa, o de lo contrario una posible ganancia ósea, sea cual sea el caso puede acarrear consecuencias

desastrosas tales como un alto riesgo de fracturas (en el caso de pérdida) o síndromes de compresión (en el caso de ganancia) (Eriksen, 2010).

El RO es llevado a cabo por una estructura anatómica y funcional conocida como “Unidad Básica Multicelular” (BMU) y requiere de la acción coordinada de cuatro principales tipos de células óseas: células de recubrimiento óseo, osteocitos, osteoclastos y osteoblastos. En un estado inactivo, la superficie del hueso es cubierta por una monocapa de células de recubrimiento óseo, las cuales pertenecen al linaje osteoblástico. Los osteocitos son las células óseas más abundantes; éstas también son diferenciadas a partir de osteoblastos y se encuentran incrustadas dentro del hueso durante el desarrollo esquelético o previamente al proceso de RO. Los osteocitos pueden funcionar como células mecanosensoras primarias y, por tanto, ellas probablemente jueguen un rol esencial en la iniciación del RO. Los osteoclastos son las únicas células capaces de llevar a cabo la función de resorción ósea, son células de gran tamaño multinucleadas que se diferencian a partir de células mononucleares (monocitos y macrófagos), linaje que es estimulado por dos factores esenciales: el Factor estimulante de Colonias de Monocitos/Macrófagos (M-CSF) y por el ligando de receptor activador para el factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) mejor conocido como ligando RANKL. La diferenciación de los osteoclastos incluye diversos pasos claves: las células troncales hematopoyéticas dan lugar a la unidad formadora de colonias de granulocitos/macrófagos, las cuales tienden a diferenciarse a células de linaje monocítico/macrófago en la médula ósea. Las células mononucleares del linaje monocítico/macrófago que se encuentran en médula ósea o en circulación, son generalmente consideradas como precursores de osteoclastos, los cuales son atraídos a los sitios de resorción prospectivos y posteriormente son atrapados en la matriz ósea para diferenciarse a osteoclastos en respuesta a M-CSF y a RANKL. Los osteoblastos son las células formadoras de hueso, las cuales se derivan a partir de células troncales mesenquimales (MSCs) a través de una vía de diferenciación de múltiples pasos. Las MSCs dan lugar a los osteoprogenitores, los cuales se diferencian en preosteoblastos y posteriormente a osteoblastos maduros (Feng & McDonald, 2011).

El proceso de remodelación (Figura 1) implica cuatro grandes fases, distintas pero superpuestas una con otra:

- 1) Iniciación/Activación del RO en un sitio específico
- 2) Resorción ósea y la concurrente concentración de MSCs y osteoprogenitores
- 3) Funcionamiento y diferenciación de osteoblastos (síntesis osteoide)
- 4) Mineralización del osteoide

Se ha propuesto que cuando los osteocitos, ya sea por deformación ósea causada por carga mecánica o por detectar algún daño en el hueso viejo o dañado, transmiten señales de una naturaleza desconocida para el reclutamiento de precursores de osteoclastos al sitio óseo específico (Feng & McDonald, 2011). En años recientes se ha propuesto que el proceso de RO ocurre en una estructura especializada y altamente vascularizada llamada “Compartimento de Remodelado Óseo” (BRC) que además se caracteriza por la presencia de una cubierta formada por células de revestimiento óseo (Eriksen, 2010).

Así, los precursores de osteoclastos pueden ser reclutados ya sea de la médula ósea mediante el cruzamiento de la monocapa de células de revestimiento óseo, o de los capilares que penetran en la BRC. Los precursores de osteoclastos se adhieren a la matriz ósea para diferenciarse a osteoclastos en respuesta a las elevadas concentraciones de M-CSF y RANKL en el interior de BRC. Con la formación de osteoclastos, el proceso de RO pasa a la fase 2, en la cual la resorción del hueso representa el evento predominante, sin embargo, también comienza el reclutamiento de MSCs y/o osteoprogenitores en la BRC. De manera similar a los precursores de osteoclastos, las MSCs y los osteoprogenitores pueden ser reclutados, ya sea directamente de la médula ósea o, de los capilares que penetran en la BRC. A lo largo de la fase 2 continúan la formación de osteoclastos y la resorción ósea al mismo tiempo que se lleva a cabo el reclutamiento de MSCs y la diferenciación de los osteoprogenitores a preosteoblastos y de manera subsecuente a osteoblastos. El proceso de remodelación entra en la fase 3 y la función de los osteoblastos (síntesis de osteoide) comienza a superar a la resorción ósea como el evento predominante. La fase 3 continúa por algún tiempo y el BRC permite que se excave más hueso por apertura de zanjas en la superficie y de esta forma, reemplazar con osteoide sintetizado por los osteoblastos. La formación y la función de los osteoblastos continúan incluso después del cese de la resorción ósea para garantizar un equilibrio entre la resorción y la formación del hueso. La fase 4 implica la mineralización del osteoide y de esta forma concluye el ciclo de RO (Feng & McDonald, 2011).

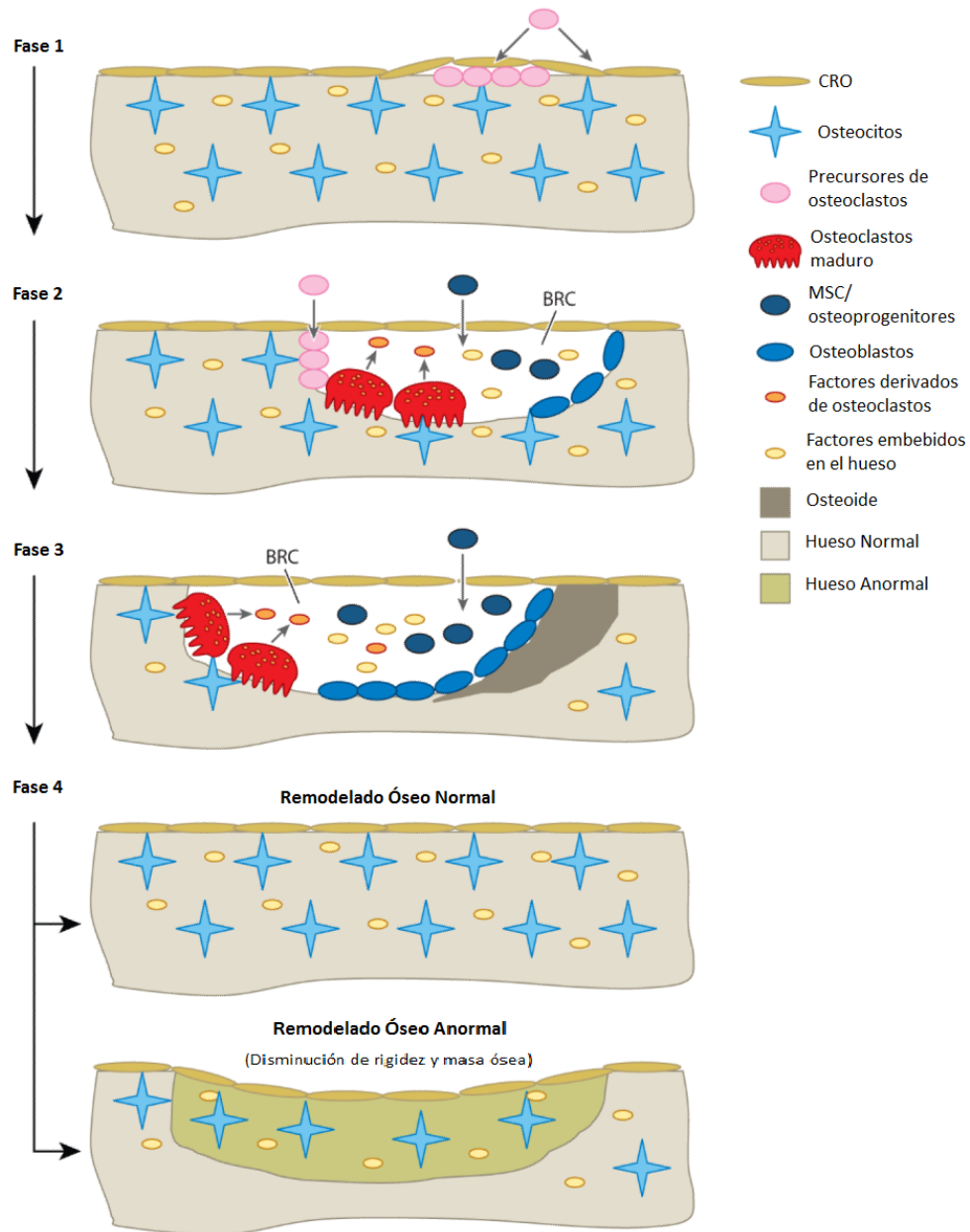


Figura 1.- Modelo de Remodelado Óseo. El proceso de remodelado óseo consta de cuatro fases distintas: **Fase1) Iniciación/Activación** del Remodelado Óseo en un sitio específico. **Fase 2) Resorción ósea** y la concurrente concentración de MSCs y osteoprogenitores. **Fase 3) Funcionamiento y diferenciación de osteoblastos** (síntesis osteoide). **Fase 4) Mineralización del osteoide**. En un RO normal, no hay cambio neto en la masa y en la fuerza ósea después de cada ciclo de remodelado. Sin embargo, en un RO anormal, bajo condiciones patológicas, tales como osteoporosis, provoca una evidente disminución de masa y fuerza óseas. (BRC: Compartimento de Remodelado Óseo; CRO: Células de Recubrimiento óseo). Figura modificada de Feng & McDonald, 2011.

1.2 EL OSTEOLASTO

Los osteoblastos durante su crecimiento activo se ubican con una organización de tipo epitelial sobre la superficie de la matriz ósea y poseen una forma cúbica o incluso cilíndrica. Son células secretoras activas con núcleo grande claro, un RER bien desarrollado (basofilia), muchos ribosomas libres y un aparato de Golgi voluminoso. Los osteoblastos están conectados a través de nexos (Welsch & Sobotta, 2008).

En cultivo celular, los osteoblastos son cercanamente parecidos a los fibroblastos (Figura 2). La única característica morfológica específica de los osteoblastos se encuentra fuera de la célula, en forma de una matriz extracelular mineralizada (Ducy, Schinke, & Karsenty, 2000).

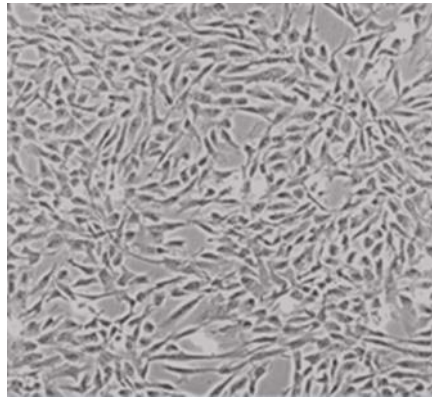


Figura 2.- Cultivo celular de Osteoblastos. Osteoblastos humanos de fémur. Figura obtenida de <http://www.sciencellonline.com/human-osteoblasts-femoral.html>

A medida que se diferencian expresan receptores de vitamina D, de PTH siendo las únicas células óseas que poseen receptores para esta hormona responsable de desencadenar la resorción ósea; expresan genes que codifican para proteínas de la matriz ósea (colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina, osteonectina y otras) y en la superficie, expresan la coenzima fosfatasa alcalina; además de producir factores de crecimiento parácrinos y autócrinos. Una vez diferenciados, se dirigen hacia la superficie ósea, donde recubren regiones de formación de hueso nuevo, depositan matriz ósea mejor conocida como “osteóide” (la cual inicialmente no se encuentra calcificada), en láminas ordenadas, e inducen su mineralización. En el proceso de mineralización, se depositan cristales de hidroxapatita sobre las capas de colágeno para producir hueso laminar. La mineralización requiere un aporte adecuado de calcio y fosfato extracelulares, así como de fosfatasa alcalina, que los

osteoblastos activos secretan en grandes cantidades. El destino de los osteoblastos senescentes no está bien definido. Algunos probablemente se convierten en células aplanadas de revestimiento (células inactivas), sobre superficies de hueso trabecular, algunos son sepultados en el hueso cortical como osteocitos y otros sufren apoptosis (Gardner & Shoback, 2012).

1.2.1 DIFERENCIACIÓN DEL OSTEOLASTO

Se originan a partir de células progenitoras mesenquimales, derivadas del mesodermo; su formación implica la diferenciación de progenitores en la proliferación de preosteoblastos, osteoblastos productores de matriz ósea, y eventualmente a osteocitos o en células de recubrimiento óseo. El marcador temprano osteoblástico, factor 2 de transcripción relacionado a Runt (Runx2) es necesario para la diferenciación de células progenitoras de linaje osteoblástico. Durante esta secuencia de proliferación celular Runx2 regula la expresión de los genes que codifican a osteocalcina, VEGF, RANKL, esclerostina, y DMP1. Osterix es otro factor de transcripción esencial para la diferenciación osteoblástica. Un gran número de factores parácrinos, autócrinos y endócrinos se encuentran involucrados en el desarrollo y maduración del osteoblasto tales como: las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), factores del crecimiento FGF e IGF, factores angiogénicos (endotelina-1), hormonas (PTH) y agonistas de prostaglandinas, todos ellos modulan la diferenciación del osteoblasto. La acción de PTH y BMPs se encuentra cercanamente asociada con la activación de la vía de señalización Wnt (Eriksen, 2010).

La diferenciación total del osteoblasto está caracterizada por la coexpresión de fosfatasa alcalina y de colágeno tipo 1, ambos muy importantes para la síntesis de la matriz ósea y la subsecuente mineralización de ésta. Los osteoblastos maduros también producen reguladores de la mineralización de la matriz ósea tales como: osteocalcina, osteopontina y osteonectina, RANKL es necesario para la diferenciación del osteoclasto además de ser receptor para PTH (PTH1R) (Eriksen, 2010).

Al final de su vida útil, algunos osteoblastos se transforman en osteocitos los cuales posteriormente son incrustados en la matriz mineralizada, o bien, se transforman en células de recubrimiento, encargadas de cubrir la superficie del hueso (Eriksen, 2010). Moléculas específicas expresadas por los osteocitos incluyen a DMP1, FGF 23 y esclerostina, las cuales controlan la formación del hueso y el metabolismo de fosfato (Eriksen, 2010).

Es importante mencionar que de principio a fin el desarrollo del osteoblasto se encuentra fuertemente regulado tanto de manera positiva como negativa, desembocando en un adecuado mantenimiento del tejido óseo o en caso contrario, en algún proceso patológico. A lo largo de los últimos años se ha reportado que la desacetilación de histonas y la metilación del DNA (mecanismos epigenéticos) regulan de manera negativa la expresión de diversos genes que juegan un papel importante en el proceso de diferenciación de ésta célula. Sin embargo, también es bien sabido que la metilación puede regular la expresión de ciertos genes que pueden alterar el desarrollo adecuado de esta célula tan importante.

1.3 MECANISMOS EPIGENÉTICOS

El término epigenética fue acuñado por C.H Waddington en 1939 y se refiere al estudio de mecanismos capaces de influir en la expresión génica de una manera potencialmente estable y heredable sin alterar la secuencia del DNA. Estos mecanismos incluyen: modificación post-traducciona de histonas, regulación post-transcripcional mediada por miRNA y metilación de DNA (Passarge, 2010).

Los procesos epigenéticos son considerados mecanismos importantes los cuales a través del ambiente y algunos otros factores promueven numerosas patologías en humanos. Es, por lo tanto, razonable suponer que varios trastornos complejos de inicio tardío multifactoriales, como la osteoporosis, podría tener un fuerte componente epigenético. El punto focal de todas las patologías esqueléticas es la desregulación del RO, mediado por los osteoblastos (formadores de hueso) y los osteoclastos (resorbedores de hueso). Con el fin de mantener ambos procesos en equilibrio, la actividad, la diferenciación y la apoptosis de ambos tipos de células tienen que ser estrictamente regulados. En particular, la diferenciación de los osteoblastos está acompañada de profundos cambios en la expresión génica (Vrtacnik, Marc, & Ostanek, 2014).

Se ha demostrado que la desacetilación de histonas y la metilación del DNA regulan negativamente la expresión de varios genes asociados con las diferentes etapas de la diferenciación del osteoblasto (Vrtacnik, Marc, & Ostanek, 2014).

1.3.1 METILACIÓN DEL DNA

Históricamente, la metilación del DNA fue descubierta en mamíferos tan pronto como se identificó al DNA como material genético. En 1948, Rollin Hotchkiss fue el primero en descubrir la modificación en citosinas en una preparación de timo de ternera empleando como técnica la cromatografía en papel. Hotchkiss planteó como hipótesis que se trataba de la fracción 5-metilcitosina (5mC) porque ésta fue separada de la citosina de una manera similar a la forma en que la timina (también conocida como metiluracilo) fue separada de uracilo y por lo tanto, sugirió que esta modificación en citosinas existe de manera natural en el DNA. Aunque muchos investigadores propusieron que la metilación del DNA puede regular la expresión génica, esto no fue hasta la década de 1980 que diversos estudios, enfocados a la inactivación del cromosoma X, a la impronta genómica y al cáncer, demostraron que la metilación del DNA estaba involucrada en la regulación génica y en la diferenciación celular. Ahora está bien reconocido que la metilación del DNA, juega un papel en el silenciamiento de elementos retrovirales y en conjunto con otros reguladores, es un factor epigenético importante que influye en las actividades de

los genes tales como la regulación de la expresión de genes tejido-específicos (Moore, Le, & Fan, 2012).

La metilación del DNA implica la adición de un grupo metil a citosinas situadas en los pares CpG (citosina/guanina). Típicamente los grupos de pares CpG desmetilados se encuentran localizados en genes tejido-específicos y en genes “housekeeping” los cuales se encuentran involucrados en funciones de mantenimiento de rutina y se expresan en la mayoría de los tejidos (Rodenhiser & Mann, 2006).

Por tanto, la metilación del DNA se define como una modificación covalente y reversible del carbono 5' de una citosina dando como producto resultante 5-metilcitosina (5mC) (Figura 4a). De manera general la metilación está asociada con la represión génica (Vrtacnik, Marc, & Ostanek, 2014).

En los organismos superiores, casi un 10% de las citosinas está metilado. Esto ocurre en los dobletes CG, conocidos como islas CpG, que se encuentran en los extremos 5' de muchos genes. La metilación del DNA es una modificación epigenética importante desde el punto de vista funcional (Passarge, 2010).

Los patrones de metilación del DNA cumplen funciones importantes ya que si ocurre alguna alteración en la metilación del DNA puede ocasionar fallas en el desarrollo y con ello generar enfermedades (Passarge, 2010).

En los mamíferos sus células contienen enzimas que mantienen la metilación del DNA y la establecen en la nueva cadena luego de la replicación; estas enzimas son las DNA metil transferasas (DNMTs) y las proteínas de unión a metil-citosinas (MeCPs) que se unen a islas CpG (Passarge, 2010).

La metilación del DNA está catalizada por una familia de DNA metiltransferasas (DNMTs) las cuales transfieren un grupo metil de S-adenosilmetionina (SAM) al carbono 5 de la citosina para formar 5-metilcitosina. DNMT3a y DNMT3b, también conocidas como DNMTs de novo, establecen un patrón nuevo de metilación sin modificar al DNA (Figura 3a). Por otra parte, DNMT1 lleva a cabo sus funciones durante la replicación del DNA para realizar una copia del patrón de metilación de la cadena de origen sobre la cadena hija sintetizada (Figura 3b). Los tres DNMTs se encuentran ampliamente involucrados en el desarrollo embrionario. En el momento en el que la diferenciación celular llega a su término, la expresión de los DNMTs se ve muy reducida, esto parece sugerir que el patrón de metilación del DNA en las células postmitóticas es estable (Moore, Le, & Fan, 2012).

Aunque el cerebro contiene algunos de los más altos niveles de metilación del DNA de cualquier tejido del cuerpo, 5mC sólo representa el 1% de los ácidos nucleicos en el genoma humano. El resto de los sitios CpG que se extienden a través del genoma se encuentran fuertemente metilados con excepción de las islas CpG (Moore, Le, & Fan, 2012).

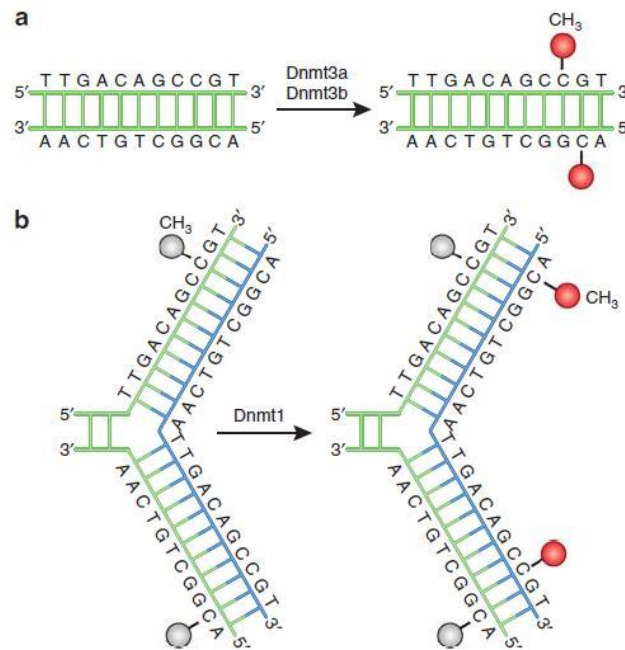


Figura 3.- Metilación del DNA. Una familia de DNA metiltransferasas (DNMTs) cataliza la transferencia de un grupo metil de S-adenosilmetionina (SAM) al carbono cinco del residuo de citosina para formar 5-metilcitosina (5mC). **a) DNMT3a y DNMT3b** son las llamadas DNMTs de novo y transfieren grupos metil (indicado en rojo) sobre el DNA desnudo. **b) DNMT1** también conocida como DNMT de mantenimiento, se encarga de mantener los patrones de metilación durante la replicación. Cuando el DNA se somete a replications semiconservativas, el DNA original preserva su patrón de metilación (indicado en gris). DNMT1 está asociado a la reproducción de focos y precisamente replica el patrón de metilación del ADN original mediante la adición de grupos metilo (indicado en rojo) en la cadena hija recién sintetizada (indicada en azul). Figura obtenida de Moore, Le & Fan, 2012.

1.3.1.1 ISLAS CpG

Las Islas CpG son extensiones de DNA de aproximadamente 1000 pares de bases que tienen una densidad superior de CpG a la del resto del genoma, sin embargo, estas no se encuentran metiladas (Figura 4b). Estos grupos o islas CpG, son dianas para proteínas que se unen a CpGs no metiladas e inician la transcripción de genes. La mayoría de los promotores de los genes, aproximadamente el 70%, se encuentran localizados entre las islas CpG, en particular, los promotores de los genes housekeeping. Las islas CpG, especialmente aquellas que están asociadas

con promotores, se encuentran fuertemente conservadas en ratas y humanos (Moore, Le, & Fan, 2012).

Parece que las islas CpG han sido conservadas evolutivamente para promover la expresión de genes mediante la regulación de la estructura de la cromatina y su vinculación con el factor de transcripción. El DNA esta regularmente envuelto alrededor de las proteínas histonas formando al llamado nucleosoma. Cuanto más fuertemente se encuentre asociado el DNA con las histonas, menos permisiva será la expresión para el gen. Una de las características comunes de las islas CpG es que contienen menos nucleosomas que otras regiones de DNA (Moore, Le, & Fan, 2012).

Algunos nucleosomas con los que las islas CpG se asocian con frecuencia, contienen histonas con modificaciones implicadas en la mejora de la expresión génica. A pesar de que aproximadamente el 50% de las islas CpG contienen sitios conocidos donde inicia la transcripción (sitios TSS, por sus siglas en inglés), las islas CpG se encuentran desprovistas de elementos comunes del promotor tales como cajas TATA. Ya que muchos sitios de unión a factores de transcripción son ricos en GC, las islas CpG tienden a potenciar la unión a los sitios de inicio de la transcripción. A pesar de su falta de elementos comunes del promotor, las islas CpG potencian la accesibilidad al DNA y promueven la unión de factores de transcripción (Moore, Le, & Fan, 2012).

La metilación de las islas CpG tiene como resultado un silenciamiento estable de la expresión del gen. Durante la gametogénesis y el desarrollo embrionario temprano, las islas CpG se someten a una metilación diferencial. La habilidad de la metilación para regular la expresión génica mediante las islas CpG es particularmente importante para el establecimiento de la impronta. Los genes improntados son expresados únicamente de uno de los dos cromosomas heredados paternos y su expresión está determinada por la herencia de los padres. Más allá de los genes improntados, la metilación del DNA de las islas CpG regula la expresión génica durante el desarrollo y la diferenciación. Ya que las islas CpG están asociadas con el control de la expresión génica, se esperaría que las islas CpG mostraran patrones de metilación de DNA tejido-específicos. Aunque las islas CpG situadas en regiones intragénicas y en otras regiones del cuerpo del gen pueden tener patrones de metilación tejido-específicos, las islas CpG asociadas a sitios de inicio de la transcripción raramente muestran patrones de metilación tejido-específicos. En regiones de las islas CpG llamadas “costas”, localizadas a 2kb de las islas CpG, contienen patrones de metilación tejido-específico fuertemente conservados. Así como en las islas CpG, la metilación de las costas CpG se encuentra fuertemente correlacionada con la reducción de la expresión del gen (Moore, Le, & Fan, 2012).

La metilación de las islas CpG puede perjudicar la unión del factor de transcripción, reclutar proteínas que reprimen la unión al grupo metil, y de forma estable, silenciar la expresión del gen (Figura 4b). Sin embargo, las islas CpG, especialmente las que se encuentran asociadas con los promotores del gen, raramente se encuentran metiladas (Moore, Le, & Fan, 2012).

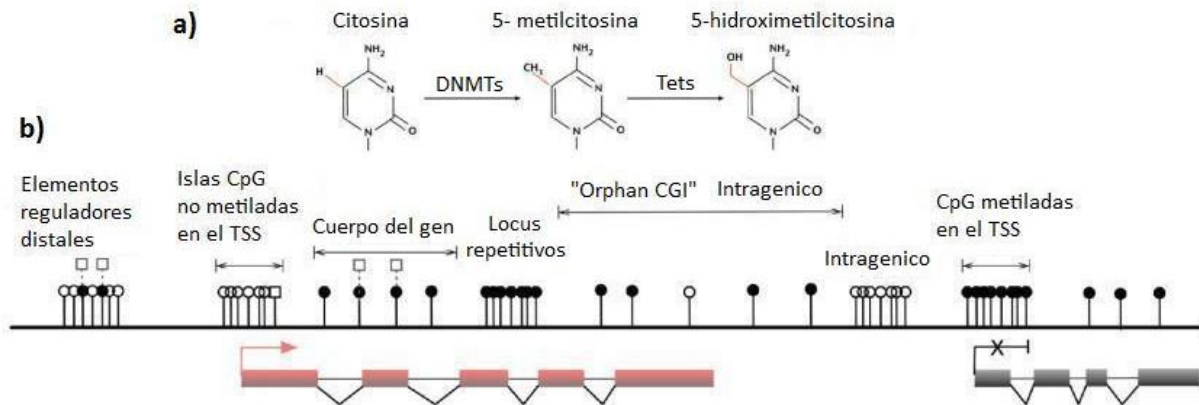


Figura 4.- Principales formas y distribución de la metilación del DNA. a) Las tres principales formas en las que se puede encontrar a la base citosina en DNA de mamíferos. La citosina es metilada covalentemente por la acción conjunta de las DNA metiltransferasas y de SAM; en el carbono 5 de su estructura dando como resultando 5- metilcitosina (5mC) la forma más común que se puede encontrar en los dinucleótidos CpG en células somáticas. 5-hidroximetilcitosina (5hmC) es resultado del proceso de metilación y una posterior hidroxilación la cual es mediada por las enzimas de translocación ten-eleven (Tet). **b) Distribución de los dinucleótidos CpG en el genoma de mamíferos.** En el genoma de vertebrados, los dinucleótidos CpG, generalmente se encuentran fuertemente metilados, en donde las islas CpG (CGIs) están asociadas con el promotor del gen y generalmente no presentan patrones de metilación. Existen excepciones en donde las CGIs se encuentran hipermetiladas, tal es el caso de la inactivación del cromosoma X. Además, también se pueden encontrar CGIs en los TSSs, de las "orphan CGI" se desconoce su función, pero han sido localizadas en el cuerpo del gen (intragénicas). Las CGIs desmetiladas en la posición 5' de múltiples genes, está correlacionada positivamente con la actividad transcripcional del gen (señalado en color rojo, del lado izquierdo), mientras que en algunos tipos celulares específicos, hay un número pequeño de genes que se encuentran hipermetilados en las CGIs localizadas en su región promotora, teniendo como consecuencia la represión del gen (señalado en color gris del lado derecho). El cuerpo del gen a menudo, se encuentra metilado, presentando un mayor grado de metilación en los exones que en los intrones, y 5hmC que es el producto de la oxidación ejercida por las enzimas Tet, se encuentra presente en el cuerpo de los genes expresados (cuadros de color blanco situados en el cuerpo del gen). (TSS: Sitio de Inicio de la Transcripción; Círculos blancos: CpGs no metilados; Círculos negros: CpGs metilados; Cuadros blancos: CpG hidroximetilados; Casillas en color rojo: exones transcritos y activos; Casillas en color negro: exones silenciados e inactivos. Los estados transcripcionales de estos genes están representados por la flecha roja indicando que se encuentra activo y la cruz de color negro indica que se encuentra inactivo). Figura modificada de Meng, y otros, 2015.

1.3.2 MECANISMO BÁSICO DE LA METILACIÓN DEL DNA

Los patrones de metilación del DNA están establecidos y a su vez, son mantenidos por las enzimas DNMTs que son esenciales para la correcta expresión génica de dichos patrones (Figura5) (Rodenhiser & Mann, 2006).

Las enzimas que establecen, reconocen y remueven la metilación del DNA se encuentran clasificadas en tres clases (Moore, Le, & Fan, 2012):

- 1) **Writers:** enzimas encargadas de catalizar la adición de grupos metil a residuos de citosinas (Figura5a).
- 2) **Erasers:** modifican y remueven el grupo metil (FIGURA 5b).
- 3) **Readers:** reconocen y se unen a los grupos metil para influir en última instancia en la expresión del gen (Figura 5c).

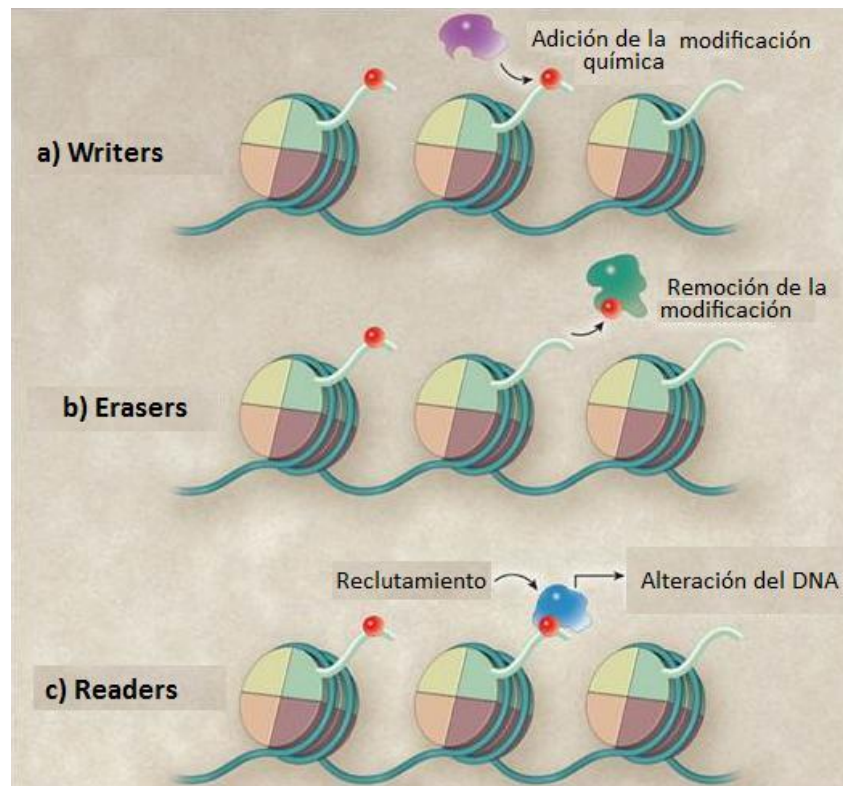


Figura 5.- Enzimas que intervienen en la metilación del DNA. Se clasifican en tres grupos diferentes a) Writers: son las DNA metiltransferasas y son las encargadas de catalizar la adición del grupo metil a la citosina. Este grupo de enzimas se subdivide a la vez en dos grupos: metiltransferasas de *novo* (DNMT3a y DNMT3b) y la metiltransferasa de mantenimiento (DNMT1). **b) Erasers:** Son las encargadas de modificar y eliminar el grupo metil. Esta acción puede llevarse a cabo por dos vías distintas: desmetilación activa y desmetilación pasiva. **c) Readers:** A este grupo pertenecen las proteínas MBDs, las UHRF y los “dedos de Zinc”, que tienen gran afinidad por las regiones metiladas y que reclutan factores de represión para mantener el gen silenciado. Éste último grupo tiene influencia directa en la expresión del gen.

1.3.2.1 ESTABLECIMIENTO DE LA METILACIÓN DEL DNA: DNMTs (Writers)

Tres de los miembros de la familia DNMT (DNA metiltransferasas) catalizan directamente la adición de grupos metil al DNA: DNMT1, DNMT3a y DNMT3b. A pesar de que estas tres enzimas comparten una estructura similar (un largo dominio regulatorio N-terminal y un dominio catalítico C-terminal), tienen funciones y patrones de expresión únicos. A diferencia de los otros DNMTs, DNMT1 metila preferentemente, DNA hemimetilado (Moore, Le, & Fan, 2012) y es sobre llamada como DNMT de mantenimiento debido a que copia el patrón de metilación de la cadena original de DNA en la cadena hija durante la replicación, aunque también posee algo de actividad de DNMT de novo (Vrtacnik, Marc, & Ostanek, 2014). Durante la replicación del DNA, DNMT1 se localiza en la horquilla de replicación en donde se forma y es nuevamente sintetizado el DNA hemimetilado. DNMT1 se une al DNA sintetizado y lo metila precisamente como el patrón de metilación anterior a la replicación del DNA (Figura 3b). Adicionalmente, DNMT1 también tiene la habilidad para reparar la metilación del DNA. Por esta razón DNMT1 es llamada DNMT de mantenimiento ya que ésta mantiene el patrón original de metilación de DNA en el linaje celular (Moore, Le, & Fan, 2012).

DNMT3a y DNMT3b son extremadamente similares en estructura y función. A diferencia de DNMT1, ambas DNMT3a y DNMT3b cuando se sobre expresan son capaces de metilar, tanto a DNA nativo como a DNA sintético sin presentar preferencia hacia DNA hemimetilado. Por esta razón, DNMT3a y DNMT3b son las principales enzimas responsables de la metilación de novo de CpGs desmetiladas y para el establecimiento de marcas de metilación del DNA durante el desarrollo embrionario y por lo tanto (Vrtacnik, Marc, & Ostanek, 2014), son referidas como DNMTs de novo. Lo que principalmente distingue a DNMT3a de DNMT3b son sus patrones de expresión génica. Aunque DNMT3a se expresa relativamente ubicua, DNMT3b es pobremente expresada por la mayoría de los tejidos diferenciados con excepción de la tiroides, los testículos y médula ósea (Moore, Le, & Fan, 2012).

El último miembro de la familia DNMT es DNMT3L, una proteína que carece del dominio catalítico que se encuentra en las otras enzimas DNMT, por lo tanto, no tiene actividad intrínseca de DNA metiltransferasa. Se expresa principalmente en el desarrollo temprano y está limitada en células germinales y en timo, en edad adulta. Aunque DNMT3L no tiene función catalítica por sí misma, esta se asocia físicamente con DNMT3a y DNMT3b y estimula su actividad de metiltransferasas (Moore, Le, & Fan, 2012).

En combinación, las metiltransferasas de actividad tanto de mantenimiento como de novo parecen constituir los componentes enzimáticos esenciales del sistema de la metilación del ADN en mamíferos (Klose & Bird, 2006).

1.3.2.2 ESTABLECIMIENTO DE LA METILACIÓN DEL DNA: METILACIÓN DE NOVO

Se han propuestos diferentes mecanismos. DNMT3a y DNMT3b pueden unirse al DNA mediante el dominio conservado PWWP, aún no se tiene muy claro cómo es que DNMT3a y DNMT3b seleccionan secuencias específicas de DNA. Una hipótesis sugiere que a través del RNA de interferencia (RNAi) es el mecanismo mediante el cual los DNMTs seleccionan secuencias específicas de DNA para ser silenciadas. Si bien el RNAi está claramente involucrado en la metilación del DNA en células de plantas, las pruebas existentes sobre el papel que juega el RNAi en la metilación en células de mamíferos aún son poco consistentes. Otra teoría es que factores de transcripción regulan la metilación *de novo* del DNA. Los factores de transcripción pueden regular la metilación del DNA mediante la unión de secuencias específicas de DNA a cualquier DNMT reclutado ya sea para la metilación o para proteger al DNA de la misma. En algunos casos, independientemente de si el gen es expresado, la unión de factores de transcripción puede ayudar a proteger los sitios CpG de la metilación *de novo*. Las islas CpG parecen ser protegidas de la metilación principalmente por la unión de factores de transcripción. Cuando los sitios de unión del factor de transcripción son mutados, las islas CpG son incapaces de conservar su estado desmetilado. Del mismo modo, como la diferenciación induce un descenso en la regulación de los factores de transcripción que se unen a los promotores de genes específicos, los sitios CpG ahora expuestos pueden ser objeto de la metilación del DNA. Estos estudios describen dos mecanismos que probablemente funcionan en conjunto para establecer la metilación *de novo* del DNA. DNMT3a y DNMT3b pueden ser reclutados a los promotores por factores específicos de transcripción de DNMT *de novo* o bien, simplemente metilar todos los sitios CpG en todo el genoma que no están protegidos por la unión a un factor de transcripción (Moore, Le, & Fan, 2012).

1.3.2.3 PÉRDIDA DE LOS PATRONES DE METILACIÓN (Erasers)

La desmetilación del DNA está caracterizada como pasiva o activa. En la desmetilación pasiva se produce una disminución gradual de los niveles de metilación de mantenimiento (ejercida por DNMT1) a lo largo de sucesivas rondas de replicación. Se produce de forma natural a lo largo del proceso de envejecimiento humano. La desmetilación activa puede ocurrir en ambos procesos celulares, tanto en división como en no división pero este proceso requiere de reacciones enzimáticas para procesar a 5mC y de esta manera revertir de nuevo a una citosina no metilada. Hasta el momento no se ha sabido que este mecanismo en células de mamíferos pueda romper la fuerte unión covalente carbono-carbono que une a la citosina a un grupo metil. En cambio la desmetilación ocurre a través de una serie

de reacciones químicas que modifican aún más a 5mC, mediante reacciones de diaminación y/o oxidación a un producto que es reconocido por la vía de reparación por escisión de base (BER) para de esta manera, reemplazar la base modificada con una citosina desnuda. A pesar de que se ha acordado, de manera general, que la vía BER es el paso final en la desmetilación del DNA, las enzimas específicas y los intermediarios químicos que se forman durante la desmetilación del DNA aún son debatidos (Moore, Le, & Fan, 2012).

Se han propuesto diferentes mecanismo de desmetilación activa del DNA (Figura 6). 5mC puede ser químicamente modificada en dos sitios: el grupo amino y el grupo metil. La diaminación del grupo amino a un grupo carbonilo mediante AID/APOBEC (citidina diaminasa inducida por activación/complejo enzimático editor de la apolipoproteína B mediante RNAm) efectivamente convierte 5mC a una timina, creando así un desajuste G/T y a su vez induciendo la vía BER para corregir la base (Moore, Le, & Fan, 2012).

Otro mecanismo de desmetilación activa de DNA parece ser que se encuentra mediado por las enzimas de translocación ten-eleven, (Tet) Tet1, Tet2 y Tet3. Las enzimas Tet adicionan un grupo hidroxilo a un grupo metil de 5mC para formar 5hmC (5-hidroximetilcitosina) (Figura 4a). Una vez que 5hmC es formado, dos mecanismos por separado pueden convertir 5hmC regresando a ser una citosina en mamíferos. En el primer mecanismo, la oxidación iterativa por las enzimas Tet continua para oxidar 5hmC primero a 5-formil-citosina y después a 5-carboxi-citosina. En el segundo mecanismo, 5hmC es diaminado por AID/APOBEC para formar 5-hidroxi-metil-uracilo (Moore, Le, & Fan, 2012).

Al igual que la metilación, 5hmC puede regular la expresión génica. En apoyo a esta teoría, la conversión de 5mC a 5hmC perjudica la unión de la proteína represora de unión a grupo metil MeCP2. Pero lo que está claro en este momento es que *in vivo* 5hmC se encuentra en tejidos de mamíferos y puede desempeñar un papel importante en la regulación de la desmetilación del DNA y la expresión genica (Moore, Le, & Fan, 2012).

En todos los mecanismos mencionados de la desmetilación activa de DNA, la vía BER utiliza a Timina DNA Glicosilasa (TDG) para escindir el residuo modificado (timina, 5-hidroximetil-uracilo, 5-formil-citosina y 5-carboxi-citosina) y reemplazarlo con una citosina desnuda. TDG es esencial para la desmetilación del DNA y es requerida para un desarrollo normal (Moore, Le, & Fan, 2012).

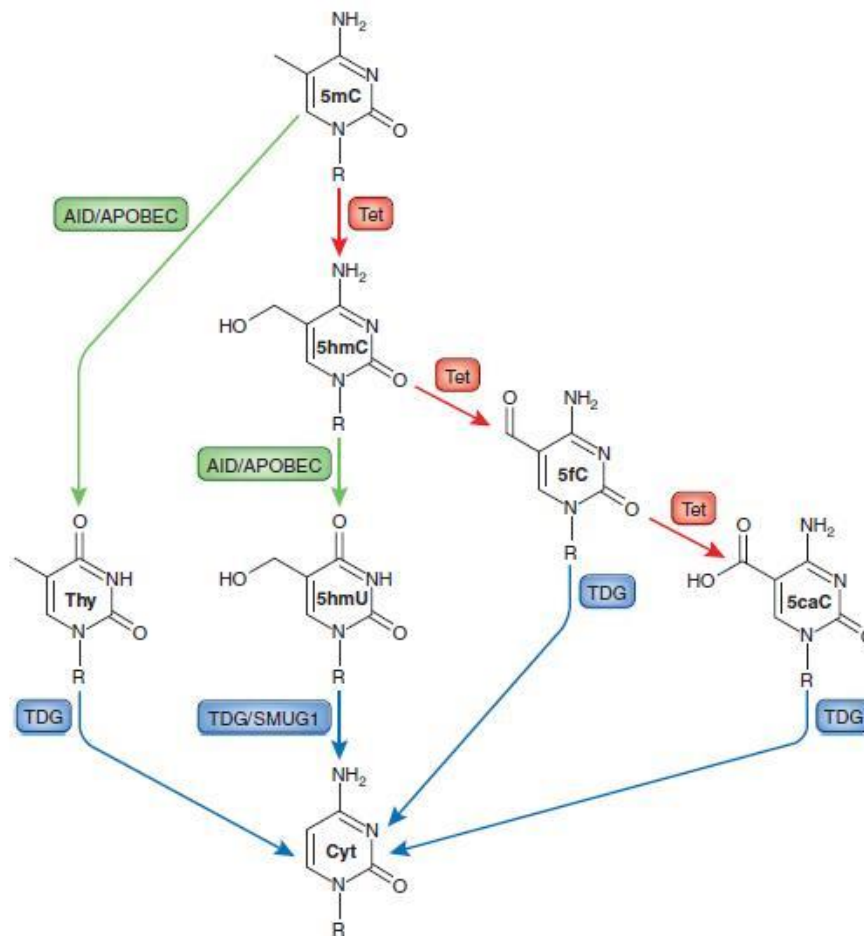


Figura 6.- Vías de desmetilación activa. 5-metilcitosina (5mC) puede ser modificada químicamente en dos sitios: en el grupo amino y en el grupo metilo. El grupo amino de 5mC puede ser diaminado (indicado en verde) por AID/APOBEC, convirtiendo a 5mC en Timina (Thy). El grupo metilo de 5mC puede ser modificado por la adición de un grupo hidroxilo por parte de las enzimas Tet para generar 5-hidroximetil-citosina (5hmC). 5hmC puede también ser modificada químicamente en dos sitios: en el grupo amino y en el grupo hidroximetilo. AID/APOBEC puede diaminar a 5hmC (indicado en verde) para producir 5-hidroximetil-uracilo (5hmU). En otra vía química para la modificación de 5hmC se ven involucradas las enzimas Tet, oxidando más a 5hmC (indicado en rojo) para formar 5-formil-citosina (5fC) y posteriormente, 5-carboxi-citosina (5caC). Eventualmente, los productos de cada vía (Thy, 5hmU, 5fC y 5caC) son reconocidos y escindidos por TDG y/o SMUG1, ambos componentes de la vía BER; para ser reemplazados con una citosina desnuda (indicado en azul). Figura obtenida de Moore, Le, & Fan, 2012.

1.3.2.4 IDENTIFICACIÓN DE LA METILACIÓN DEL DNA (Readers): REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN

Mientras que la metilación del DNA puede por sí misma reducir la expresión génica al afectar la unión de activadores transcripcionales, una segunda clase de proteínas con alta afinidad por 5mC inhibe el factor de unión de transcripción. La metilación del DNA es reconocida por tres familias de proteínas: las MBD, las UHRF y los “dedos de Zinc”. De estas familias, las proteínas MBD fueron las primeras en ser identificadas. Estas proteínas contienen un dominio conservado de unión a metil-CpG (MBD) que le confiere una alta afinidad por únicamente sitios CpG metilados. Esta familia incluye a MeCP2, la primera proteína de unión a grupo metil identificada, junto con MBD1, MBD2, MBD3 y MBD4. Las MBDs son mayormente expresadas en cerebro que en cualquier otro tejido, algunas MBDs son importantes para un normal desarrollo y funcionamiento neuronal. De la familia MBD, MBD3 y MBD4 son inusuales. Por ejemplo, MBD3 es incapaz de unirse directamente al DNA debido a una mutación en su dominio MBD. Aunque MBD4 se une normalmente al DNA, preferentemente reconoce a su sitio de unión cuando una guanina se empareja con una timina, con un uracilo o con un 5-fluorouracilo y se asocia con las proteínas implicadas en la reparación del mal emparejamiento del DNA (Moore, Le, & Fan, 2012).

El resto de los miembros de la familia MBD tienen la habilidad de unirse directamente al DNA metilado y contienen un dominio de represión transcripcional (TRD) que permite a las proteínas MBD unirse a una variedad de complejos represores. Además de su papel como represor transcripcional, MeCP2 parece tener un papel único en el mantenimiento de la metilación del DNA. MeCP2 se une a DNMT1 a través de su TRD y puede reclutar a DNMT1 al DNA hemimetilado para llevar a cabo la metilación de mantenimiento. A pesar de que las MBDs son las proteínas de unión a metil mejor estudiadas, no significa que sean las únicas (Moore, Le, & Fan, 2012).

El grupo de proteínas UHRF incluyen a UHRF1 y a UHRF2, proteínas multidominio que “tiran” hacia afuera y se unen a citosinas metiladas a través de un dominio SET- y de dominios de unión a DNA asociados a RING. A diferencia de la mayoría de las proteínas de unión a grupo metil, la función primaria de las proteínas UHRF no es unirse al DNA y reprimir la transcripción. La familia de proteínas UHRF primero se une a DNMT1 y luego se dirige a DNA hemimetilado con el fin de mantener la metilación del DNA, especialmente durante la replicación del DNA. UHRF1 parece interactuar tan estrechamente con DNMT1 que su eliminación, así como la supresión de DNMT1, conducen a la letalidad embrionaria (Moore, Le, & Fan, 2012).

Las proteínas MBD sirven como un fuerte ligante entre la metilación del DNA y la modificación de histonas. Ambas, las proteínas MBD y UHRF interactúan con el DNA metilado y las histonas para intensificar la represión de genes. MeCP2 recluta desacetilasas de histonas para remover la modificación activa de histonas y reprimir la transcripción de genes. En general, la metilación del DNA y la modificación de histonas trabajan en conjunto para regular la expresión de genes (Moore, Le, & Fan, 2012).

La última familia de proteínas de unión a grupo metil se une a DNA metilado a través de un dominio de dedos de zinc y está compuesto de Kaiso, ZBTB4, y ZBTB38. A pesar de que ZBTB4 y ZBTB38 tienen patrones de expresión en distintos tejidos, ambos son altamente expresados en cerebro y pueden unirse únicamente a regiones CpG metiladas. Las proteínas de dominio de dedos de zinc son inusuales. A pesar de su habilidad para reconocer a metilcitosinas, ambos Kaiso y ZBTB4 tienen preferencia para unirse a secuencias motivo que carecen de metilcitosinas. A diferencia de otras proteínas de unión a grupo metil, Kaiso, preferentemente se une a dos sitios CpG metilados o a secuencias de DNA a fines que no contienen sitio metil-CpG (Moore, Le, & Fan, 2012; Klose & Bird, 2006). Sin embargo, a pesar de sus diferencias, las proteínas dominio dedos de Zinc, similares a la familia MBD, reprimen la transcripción en una manera dependiente de la metilación del DNA (Moore, Le, & Fan, 2012).

1.4 VIA DE SEÑALIZACIÓN Wnt

La familia Wnt consiste en un número de genes altamente conservados que regulan la expresión génica, el comportamiento, la adhesión y la polaridad de la célula. Esta familia incluye un total de 19 genes en humanos y en ratones, 7 en *Drosophila*, y 5 en *C. elegans*.

La producción y secreción de ligandos Wnt requiere de la modificación de lípidos por la enzima acetil transferasa Porcupina (Prcn) seguida de la unión de Wntless (Wls), el cual sirve como chaperona Wnt facilitando el transporte del lípido Wnt modificado hacia la membrana plasmática (Figura 7) (Wang, y otros, 2014).

Los ligandos Wnt son glicoproteínas secretadas lípido-modificadas, ricas en cisteína de aproximadamente 350-400aa que contienen un péptido señal N-terminal para su secreción, que activan la superficie celular mediante vías de transducción de señales a través de receptores para regular una variedad de actividades celulares que incluyen la diferenciación, proliferación, migración, polaridad y la expresión génica en la célula. Las proteínas de señalización Wnt son esenciales durante la embriogénesis y en la homeostasis de tejidos adultos ayudando a su regeneración tales como tejido linfóide, colon, piel, folículos pilosos y hueso (Westendorf, Khaler, & Schroeder, 2004).

Datos genéticos y bioquímicos han demostrado que las proteínas Frizzled (Fz) son los principales receptores para los ligandos Wnt. Estas proteínas transmiten las señales a través de ambas vías Wnt (β -catenina dependiente y β -catenina independiente). Los miembros de la familia Frizzled se caracterizan por tener:

- Una secuencia señal putativa seguida de otra secuencia de 120 aminoácidos que contiene 10 dominios fuertemente conservados ricos en cisteína (CRD), siendo su sitio de unión.
- Una región muy divergente de 40-100 aa predecesora de una forma flexible de unión.
- Siete segmentos transmembranales separados por un pequeño loop citoplásmico y extracelular (Wang, y otros, 2014).

La activación de esta vía induce diversas señales intracelulares que en conjunto se divide en dos grandes grupos: la vía canónica o clásica y la vía no canónica, de las cuales la primera es la mejor conocida (Escobar & Hawkins, 2009).

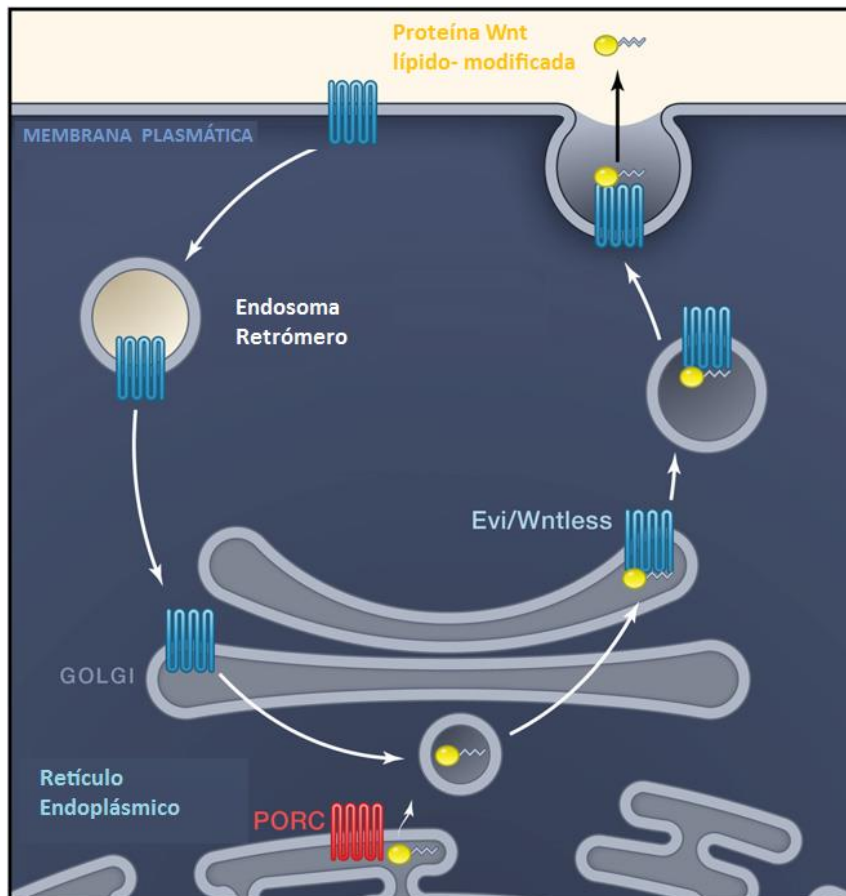


Figura 7.- Maquinaria de Secreción de ligandos Wnt. La modificación lipídica de las proteínas Wnt se lleva a cabo en el Retículo Endoplásmico (RE) por acción de la enzima Porcupina (Porc). El transporte y la secreción son dependientes de la proteína transmembranal Evi/Wntless. El Retrómero es necesario para reciclar las vesículas endosomales de Evi/Wntless. Figura modificada de Clevers & Nusse, 2012.

Los Wnts activan al menos tres cascadas de señalización intracelulares distintas que forman parte de la división de la vía de señalización Wnt antes mencionada (Figura 8):

- 1) Wnt β -catenina dependiente (vía canónica): Promueve el destino, la proliferación y supervivencia de la célula mediante el incremento de los niveles de β -catenina, además, está involucrada en la alteración de la expresión génica a través de los factores de transcripción Lef/Tcf
- 2) Wnt dependiente de calcio (Wnt/ Ca^{2+}): Estimula las proteínas G heterotriméricas, incrementa los niveles intracelulares de Ca^{2+} , disminuye los niveles de GMP cíclico y activa a la proteína cinasa C (PKC) para inducir el factor nuclear de linfocito T activado (NF-AT) y otros factores de transcripción.
- 3) Vía de polaridad celular Wnt-planar (Wnt-PCP): Activa a las GTPasas Rho/Rac y a la cinasa Jun N-terminal (JNK) para modular la organización del citoesqueleto y la expresión génica. (Westendorf, Khaler, & Schroeder, 2004)

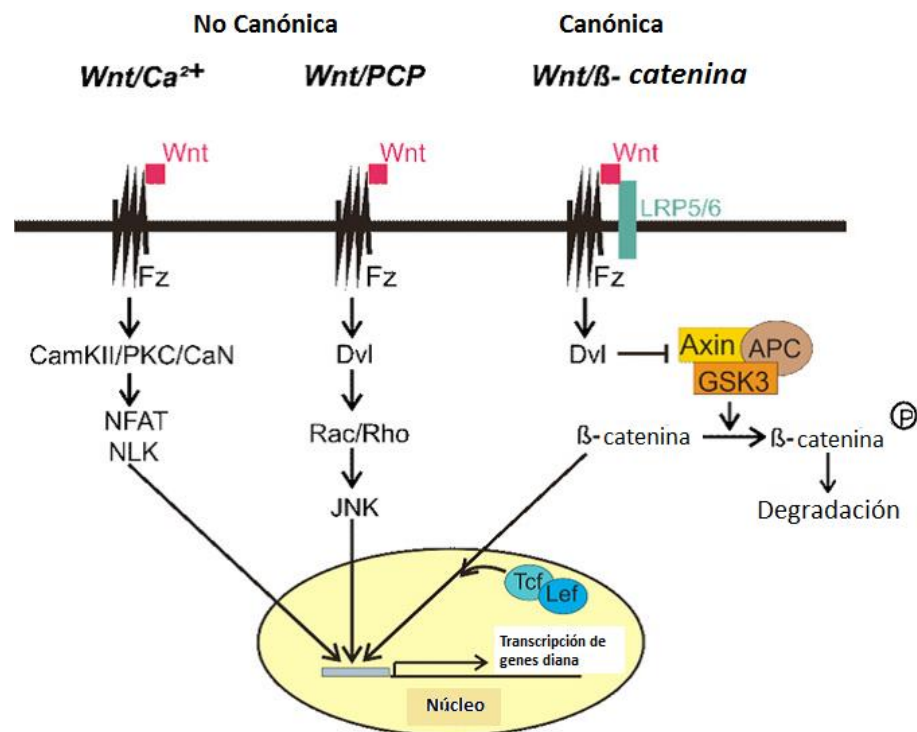


Figura 8.- Visión general de las diferentes vías de señalización Wnt. La unión de Wnts a su receptor o a su complejo receptor, puede llevarse a cabo en cualquiera de las vías Wnt: en las vías no canónicas (Wnt/ Ca^{2+} ; Wnt-PCP) o en su defecto, por la vía canónica. **Figura modificada de Piters, Boudin, & Hul, 2008.**

1.4.1 VÍA DE SEÑALIZACIÓN Wnt β -catenina (CANÓNICA)

La vía de señalización Wnt β -catenina es la mejor estudiada de las vías Wnt. Aunque las señales Wnt en interacción con otras vías de señalización (Notch, Hedgehog, Rac/K-RAS y mTOR) regulan el crecimiento, la diferenciación, la función y la muerte celular en ciertos tejidos; ésta es central en el desarrollo y la homeostasis del tejido óseo en adultos. La señalización Wnt ha sido estudiada primordialmente en embriones en desarrollo, en los cuales las células responden a Wnt en un contexto de manera dependiente, sin embargo, los Wnts también tienen funciones importantes en adultos (Wang, y otros, 2014).

La actividad de la vía de señalización Wnt canónica depende de la concentración citoplasmática de β -catenina. Implica la inducción de una cascada de señales que da como resultado la translocación de β -catenina en el núcleo en donde se asocia con el factor de unión estimulador linfocitario (Lef) y con el factor de transcripción específico de células T (Tcf's) dando como resultado la expresión de genes diana (Peters, Boudin, & Hul, 2008).

Durante el estado inactivo "OFF" (Figura 12) de la vía canónica, β -catenina se une al complejo de destrucción que se encuentra constituido de Axina, Poliposis Coli Adenomatosa (APC), y de Glucógeno Sintasa Cinasa 3 β (GSK-3 β), en donde la fosforilación es llevada a cabo por GSK-3 β para ser reconocidos por una proteína que contiene repeticiones β -transducina (β -TrCP) para posteriormente, ser degradada en proteosoma. Previo a la fosforilación por GSK3 β , se requiere la fosforilación de serina 45 en β -catenina por caseína cinasa 1 (CK1), en donde CK1 se une a Axina. Al mismo tiempo la actividad transcripcional de TCF es inhibida por el correpresor Groucho. Sin embargo, tras la unión del ligando Wnt al receptor de membrana Frizzled (Fz) y al correceptor lipoproteico de baja densidad LRP (LRP-5/6), la vía de señalización Wnt canónica es activada "ON" (Figura 9). Esta interacción hace que Axina y la fosfoproteína Disheveled (DVL) se unan a LRP5/6 fosforilado, inhibiendo la función del complejo de destrucción, lo que resulta en un incremento en el nivel de β -catenina en el citoplasma. Posteriormente β -catenina es translocada en el núcleo, junto con el factor de unión estimulador linfocitario y al factor de transcripción de células T (TCF/LEF) desplazando a Groucho, para inducir la transcripción de genes diana de la vía Wnt tales como c-Myc, c-Jun, CCND1, PPAR δ , FOSL1, UTERIN (genes relacionados con el crecimiento y la proliferación celular) y ciclina D (Surana, y otros, 2014; Ochoa, Juárez, Rosales, & Barros, 2012).

1.4.1.1 REGULACIÓN DE LA VÍA CANÓNICA

Como anteriormente se mencionó, la señalización Wnt canónica es inducida a través de la unión de una molécula Wnt a su complejo receptor. Esta vía de señalización puede ser regulada de forma extracelular a través de la membrana celular, del citoplasma, así como también en el núcleo, sin embargo, se ha sugerido que la señalización Wnt es regulada por diversas clases de moduladores negativos llamados “antagonistas” (Piters, Boudin, & Hul, 2008).

Los antagonistas Wnt pueden ser divididos en dos clases basándonos en sus mecanismos de acción. La primera clase incluye a la familia de SFRPs, Factor Inhibidor Wnt (WIF) -1 y a Cerberus. Esta clase de antagonistas Wnt, se unen directamente a proteínas Wnt así como a receptores Fz siendo capaces de bloquear todas las vías de señalización Wnt. La segunda clase se encuentra conformada por los miembros de la familia Dickkopfs (DKKs) los cuales se unen a los correceptores Wnt LRP-5/6 e inhiben toda la vía Wnt β -catenina (Surana, y otros, 2014).

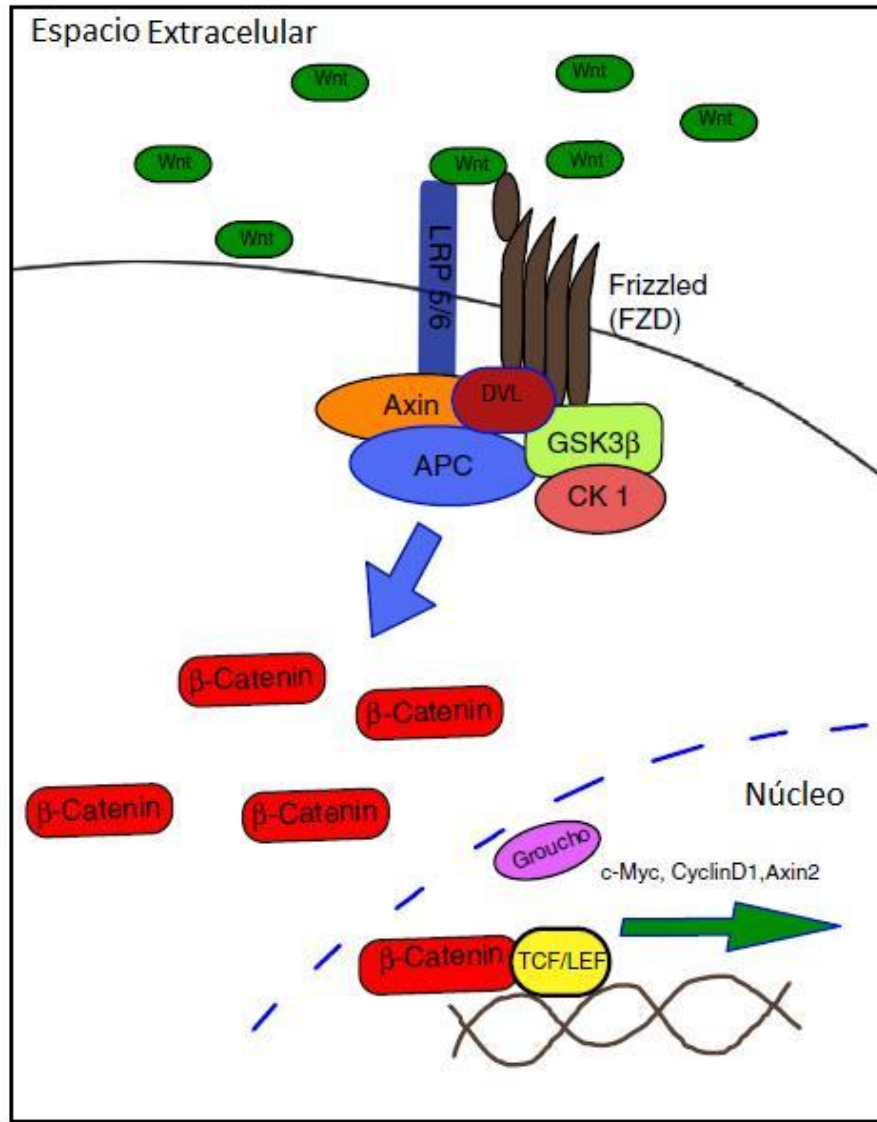


Figura 9.- Vía de señalización Wnt canónica (estado "ON"). Al unirse la glicoproteína secretada Wnt a su receptor Fz en la membrana celular, comienza la señalización iniciando la comunicación con el complejo de Axina, que inhibe la fosforilación y degradación de β -catenina. En seguida β -catenina se acumula en el citoplasma y posteriormente, se transloca en el núcleo, en donde interactúa con TCF/LEF y con otras familias de factores de transcripción para regular la expresión de genes diana. Figura modificada de Surana, y otros, 2014.

1.4.2 VIA DE SEÑALIZACIÓN Wnt β -catenina Y SU PARTICIPACIÓN EN EL METABOLISMO ÓSEO Y EN LA DIFERENCIACIÓN DEL OSTEÓBLASTO

La vía de señalización Wnt canónica en el tejido óseo, participa en diferentes fases del desarrollo del hueso, en los procesos de condrogénesis, osteoblastogénesis y osteoclastogénesis, resaltando especialmente su participación durante la diferenciación del osteoblasto (Wang, y otros, 2014).

Diversos estudios han puesto de manifiesto que la vía de señalización Wnt β -catenina regula diferentes estadios de la osteoblastogénesis, incluyendo: la renovación de células troncales, la estimulación de preosteoblastos y la inducción de la osteoblastogénesis.

Los osteoblastos son las principales dianas celulares de la vía Wnt: la β -catenina es esencial para determinar si los progenitores mesenquimales se convierten en osteoblastos (Figura 10), indicando que la vía de señalización Wnt puede afectar el papel final ejercido por el osteoblasto. Un mecanismo adicional por el cual Wnt puede controlar la función del osteoblasto es mediante el bloqueo de la condrogénesis y la adipogénesis, ya que puede inhibir factores de transcripción adipogénica como C/EBP α y PPAR γ , tal y como se ha demostrado *in vivo* con ratones transgénicos tipo Wnt/Ob, o *in vitro*, aunque no se ha objetivado firmemente una conexión directa e inversa entre los mecanismos que interfieren en estas dos líneas mesenquimales (Figura 11) (Escobar & Hawkins, 2009).

Un mecanismo regulador importante del RO se asume como un mecanismo feedback negativo a través de la supresión de la formación ósea debido a la expresión de esclerostina en el osteocito, de esta manera se inhibe la señalización Wnt en osteoblastos maduros (Figura 11). Una explicación parcial adicional del efecto osteogénico de la señalización Wnt es que reduce la apoptosis de los osteoblastos y osteocitos en el hueso (Piters, Boudin, & Hul, 2008).

En estudios *in vitro* se ha demostrado que la activación de la vía Wnt favorece la diferenciación de los precursores osteoblásticos a través de la inducción de Runx2/Cbaf y otros factores de transcripción. Por el contrario, los elementos inhibidores de esta vía, como la proteína soluble frizzled, tienen un efecto negativo sobre la supervivencia de los osteoblastos. Por otro lado, los estudios con animales transgénicos han demostrado importantes cambios esqueléticos cuando se altera la expresión de algunos genes de esta vía, como Wnt-10b, β -catenina, la proteína soluble frizzled o las propias LRP5 y LRP6 (Velasco & Riancho, 2008).

Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que la vía de señalización Wnt puede determinar el destino celular de los precursores mesenquimales, al mismo tiempo que la actividad formadora de hueso del osteoblasto. Por tanto, la vía Wnt canónica controla a los osteoblastos en diferentes niveles: diferenciación, proliferación o apoptosis, y función final (Escobar & Hawkins, 2009).

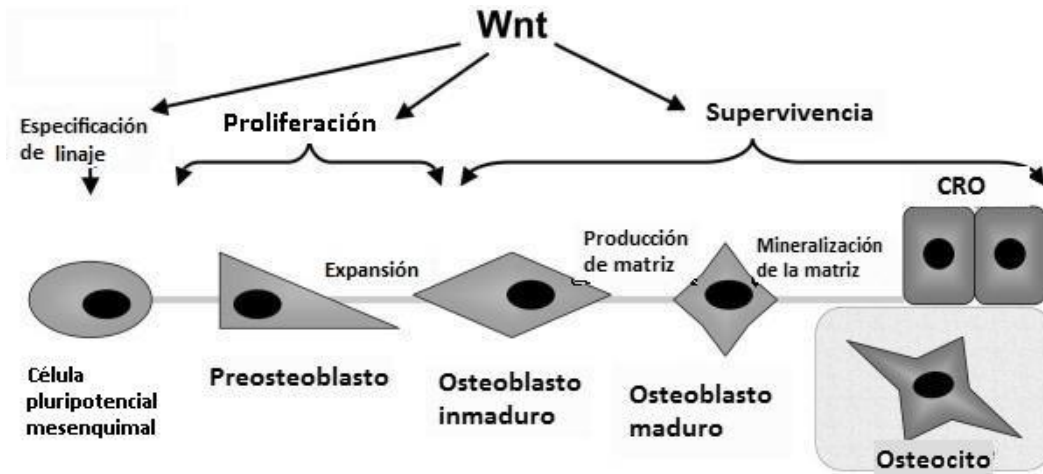


Figura 10- Wnt en la diferenciación del Osteoblasto. La Vía de señalización Wnt tiene efectos en las múltiples etapas de maduración del linaje osteoblástico. (CRO: Células de Recubrimiento óseo) Figura modificada de Hoepfner, Secreto, & Westendorf, 2009.

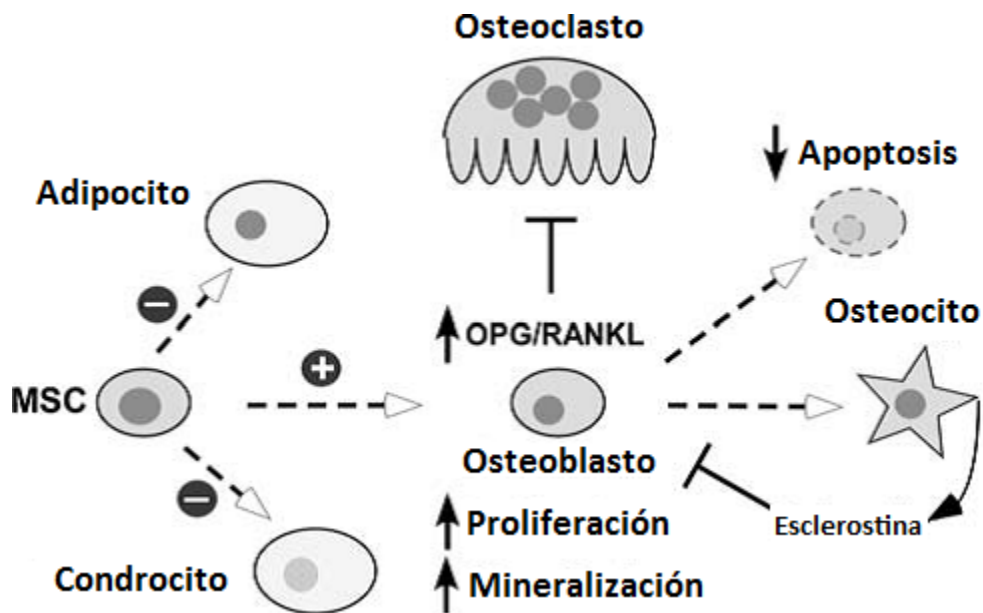


Figura 11.- Papel ejercido por la Vía Wnt canónica en la diferenciación del Osteoblasto. La vía de señalización Wnt canónica, promueve la diferenciación del osteoblasto a partir de células troncales mesenquimales (MSCs), mientras es inhibida la diferenciación de adipocitos y condrocitos. La señalización Wnt mejora la proliferación y mineralización de los osteoblastos y bloquea su apoptosis, mientras que bloquea la actividad y diferenciación de los osteoclastos mediante el incremento de OPG/RNKL. La esclerostina, es expresada en osteocitos y se encarga de suprimir la proliferación y función de los osteoblastos ya que se trata de un inhibidor de la señalización Wnt canónica. Figura modificada de Kubota, Michigami, & Ozono, 2009.

1.5 FAMILIA DE PROTEÍNAS SECRETADAS RELACIONADAS CON FRIZZLED (SFRPs)

Los genes de la familia SFRP codifican para proteínas denominadas Proteínas Secretadas Relacionadas con *Frizzled* (SFRP). Estos genes se encuentran organizados a lo largo del genoma tal y como se indica en la tabla 1, en la que se condensa la información referente a ellos. En humanos, esta familia se compone de cinco miembros, SFRP1 a SFRP5, y ortólogos de estos genes se han encontrado en todas las especies de vertebrados.

Las proteínas secretadas relacionadas con *Frizzled* (SFRPs) comprenden una familia de 5 proteínas en mamíferos que fueron identificados como los primeros antagonistas de la vía de señalización Wnt β -catenina durante el proceso de embriogénesis. Los SFRPs funcionan como receptores solubles “señuelo” para ligandos Wnt, y por lo tanto antagonizan ambas vías de señalización Wnt, tanto β -catenina dependiente como no canónica (Haraguchi, y otros, 2016).

El miembro fundador Frzb se identificó inicialmente por su similitud de secuencia con los receptores Fz e inmediatamente se asoció con la señalización Wnt por su habilidad para unirse a Wnt8 y bloquear la señalización en *Xenopus*. Al mismo tiempo, los miembros adicionales de esta familia se aislaron de diferentes formas: por la homología de su secuencia con los receptores Fz o, independientemente de la actividad Wnt, a través de su participación en el proceso de apoptosis o, de su co-purificación con el factor de unión a heparina (Bovolenta, Esteve, Ruiz, Cisneros, & Lopez-Ríos, 2008).

Inicialmente las proteínas SFRP fueron identificadas como “Proteínas Secretadas Relacionadas con Procesos de Apoptosis (SARP)”.

Tabla 1.- Cuadro comparativo entre los genes de la familia SFRP.

Nombre del Gen	Localización cromosómica	Tamaño (No. de bases)	No. de exones
SFRP1	8p11.21	47515	3
SFRP2	4q31.3	8487	3
SFRP4	7p14.1	10836	6
SFRP5	10q24.1	5392	3

Fuente de información: www.ncbi.nlm.nih

1.5.1 ESTRUCTURA Y FUNCIONES DE LAS PROTEÍNAS SFRP

Los SFRPs tienen una longitud de aproximadamente 300 aminoácidos, poseen una secuencia señal y un dominio rico en cisteína (CRD) como los receptores Fz constituyendo la terminal N y una región hidrófila de unión a heparina, que constituye la terminal C. Su dominio CRD posee 10 residuos conservados de cisteína y su secuencia presenta una homología muy cercana al dominio CRD de la región extracelular del receptor Fz. Esta homología es la causante de la competencia que existe entre los SFRPs con los receptores Fz para unirse a ligandos Wnt ya que los SFRPs se unen a ellos a través de su CRD impidiendo de este modo, su unión con el receptor Fz antagonizando la vía de señalización Wnt, ya sea interactuando directamente con ligandos Wnt para prevenir su asociación con su receptor Fz o uniéndose directamente a proteínas receptoras Fz formando un complejo sin funcionalidad (Figura 12). Sin embargo, a diferencia de los receptores Fz, los SFRPs carecen de un dominio transmembranal o citosólico (Surana, y otros, 2014; Wang, y otros, 2014; Hoepfner, Secretó, & Westendorf, 2009). Se piensa que uno de los fines fisiológicos de los SFRPs consiste en formar un gradiente local morfogénico durante la embriogénesis antagonizando localmente la vía Wnt β -catenina. Por otra parte, elevados niveles séricos de SFRPs han sido documentados en condiciones patológicas tales como: obesidad, diabetes y osteoporosis (Haraguchi, y otros, 2016).

También los SFRPs y moléculas tipo SFRP afectan la progresión del ciclo celular y provocan un decremento en la proliferación celular en tumores. Son considerados como potenciales antagonistas de Wnt y también una nueva clase de supresores tumorales. Numerosos estudios han reportado una baja regulación de los miembros SFRP en varios tipos de cáncer, indicando una pérdida de la función (Surana, y otros, 2014).

En la tabla 2, se resume la información acerca de algunas funciones reguladas por las proteínas SFRP.

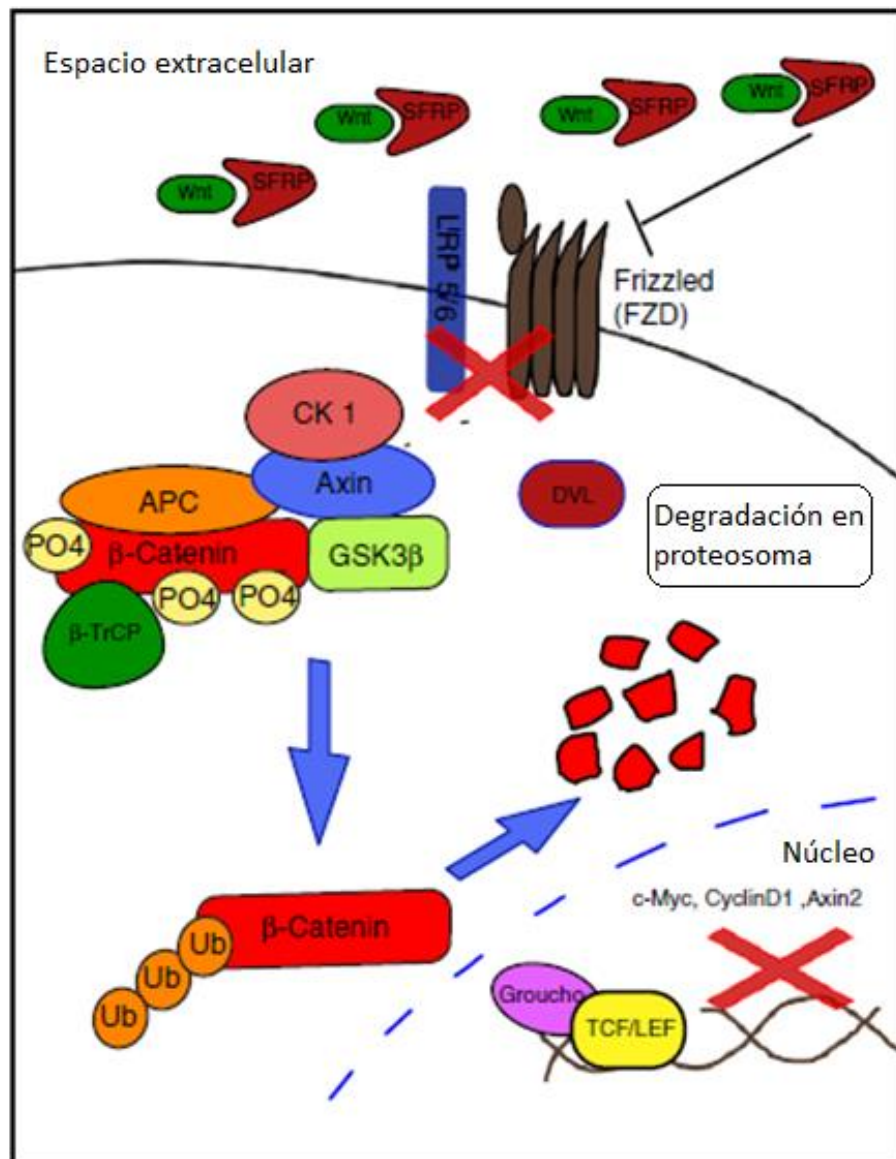


Figura 12.- SFRPs mediadores inhibitorios de Wnt. En presencia de SFRPs, la vía de señalización Wnt canónica, es inhibida (estado "OFF"), debido a la unión directa de SFRPs a Wnts o a receptores Fz; provocando la fosforilación de β-catenina seguida de su ubiquitinación, para finalmente, ser degradada por el proteosoma. Figura modificada de Surana, y otros, 2014.

Tabla 2.- Cuadro comparativo de la familia de proteínas SFRP.

PROTEÍNA	TAMAÑO (aa)	LOCALIZACIÓN CELULAR	FUNCIONES DE LA PROTEÍNA	EXPRESIÓN EN TEJIDOS	DOMINIOS CONSERVADOS
SFRP1	314	Espacio extracelular	Modulador de la vía de señalización Wnt Regula negativamente el crecimiento, la proliferación y diferenciación celular Disminuye los niveles intracelulares de β -catenina Regulador negativo en la diferenciación y proliferación de OB Regulador negativo en el RO En ambientes <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> tiene efectos antiproliferativos en células vasculares <i>In vivo</i> induce respuesta angiogénica	Ausente en pulmón, hígado y leucocitos Los niveles más altos se presentan en corazón y riñón También se expresa en testículos, cerebro, células de tejido muscular, fibroblastos y queratocitos	CRD (Domino rico en Cisteína) y NTR (Dominio Relacionado con Netrina)
SFRP2	295	Espacio extracelular	Modulador de la vía de señalización Wnt Regula la diferenciación y el crecimiento celular Participa en la morfogénesis del hueso Importante regulador durante el desarrollo de la retina	Tejido adiposo Corazón Músculo esquelético Páncreas Timo Próstata Testículos Intestino delgado y colon	CRD (Domino rico en Cisteína) y NTR (Dominio Relacionado con Netrina)
SFRP4	346	Espacio extracelular	Modulador de la vía de señalización Wnt Regula la diferenciación y el crecimiento celular Regulador de la morfología y función uterina Incrementa el proceso de apoptosis durante la ovulación Tiene efectos fosfatúricos	Células mesénquimales Cardiomiocitos Expresión de moderada a alta en tumores de ovario Altamente expresado en el estroma de endometrio proliferativo	CRD (Domino rico en Cisteína) y NTR (Dominio Relacionado con Netrina)
SFRP5	317	Espacio extracelular	Modulador de la vía de señalización Wnt Puede estar involucrado en la determinación de la polaridad de los fotorreceptores y tal vez en otras células de la retina Participa en la morfogénesis de la estructura anatómica	Altamente expresado en el epitelio de la retina y páncreas Expresión débil en corazón, hígado y músculo	CRD (Domino rico en Cisteína) y NTR (Dominio Relacionado con Netrina)

Fuente de información: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; <http://www.ebi.ac.uk>

1.5.2 IMPACTO DE LA FAMILIA SFRP EN EL TEJIDO ÓSEO

A pesar de un perfil amplio de expresión en tejidos, varias líneas de evidencia, sugieren que la inhibición de SFRP1 estimula la vía de señalización Wnt canónica promoviendo la acumulación de hueso. Bodine y colaboradores demostraron que SFRP1 es un importante regulador de osteoblastos y osteocitos para su supervivencia en ambientes *in vitro* e *in vivo*. Desarrollaron una línea SFRP1^{-/-} de ratón y demostraron que la deleción de SFRP1 no solamente reduce la apoptosis en osteoblastos y osteocitos, sino que también potencializa la proliferación y diferenciación del osteoblasto, e incrementa la formación de hueso trabecular (Wang, y otros, 2014). Por otro lado, ratones deficientes de SFRP1 presentan un incremento en la densidad mineral ósea trabecular, en el volumen y aposición mineral; pero ningún cambio en la densidad ósea cortical (Hoepfner, Secreto, & Westendorf, 2009). La deleción de SFRP1 también previene la pérdida de hueso asociada con la edad y reduce el porcentaje de grasa en el cuerpo (Hoepfner, Secreto, & Westendorf, 2009). Ratones transgénicos SFRP1 presentan bloqueo en la formación de huesos y disminución en la masa ósea trabecular. Según Gillespie y colaboradores, SFRP1 también juega un papel en el receptor activador del ligando NF- κ B dependiente de RANKL formador de osteoblastos (Wang, y otros, 2014).

Mientras tanto la administración de SFRP1 recombinante de humano reduce la densidad de hueso de fémur proximal y el volumen de hueso trabecular en ratas. La sobreexpresión de SFRP1 en osteoblastos inmortalizados de origen humano suprime la señalización Wnt canónica en un 70% y acelera el proceso apoptótico, implicando a SFRP1 como un regulador negativo para la supervivencia de osteoblastos y osteocitos (Hoepfner, Secreto, & Westendorf, 2009).

Por otra parte, SFRP2 y SFRP4 son requeridos para el desarrollo de extremidades y para la formación de huesos (Wang, y otros, 2014).

1.5.3 REPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL POR HIPERMETILACIÓN DE LOS GENES SFRP

Como se señaló anteriormente, los SFRPs, antagonistas de Wnt, son comúnmente identificados en estudios de perfiles de transcripción de osteoblastos; siendo SFRP1 el gen más regulado a ese nivel, sugiriendo que juega un papel importante durante la diferenciación del osteoblasto y en el proceso de la formación ósea (Bodine, y otros, 2005).

Diversas investigaciones han puesto de manifiesto que los genes SFRP son a menudo silenciados por mecanismos epigenéticos. Se ha demostrado que durante las etapas del proceso carcinogénico, la inactivación epigenética por medio de la hipermetilación de los genes SFRP alrededor del sitio de inicio de la transcripción, permite el silenciamiento de estos genes en mesotelioma y en cáncer colorectal en humanos (Figura 13) (Haraguchi, y otros, 2016); por ello se han utilizado agentes químicos para revertir el estado de metilación de los promotores de los genes silenciados resultando en una consecuente reactivación.

Intervenciones que revierten las modificaciones epigenéticas han sido consideradas como una propuesta para la reactivación de genes silenciados epigeneticamente por hipermetilación, incluidos los genes SFRP (Surana, y otros, 2014).

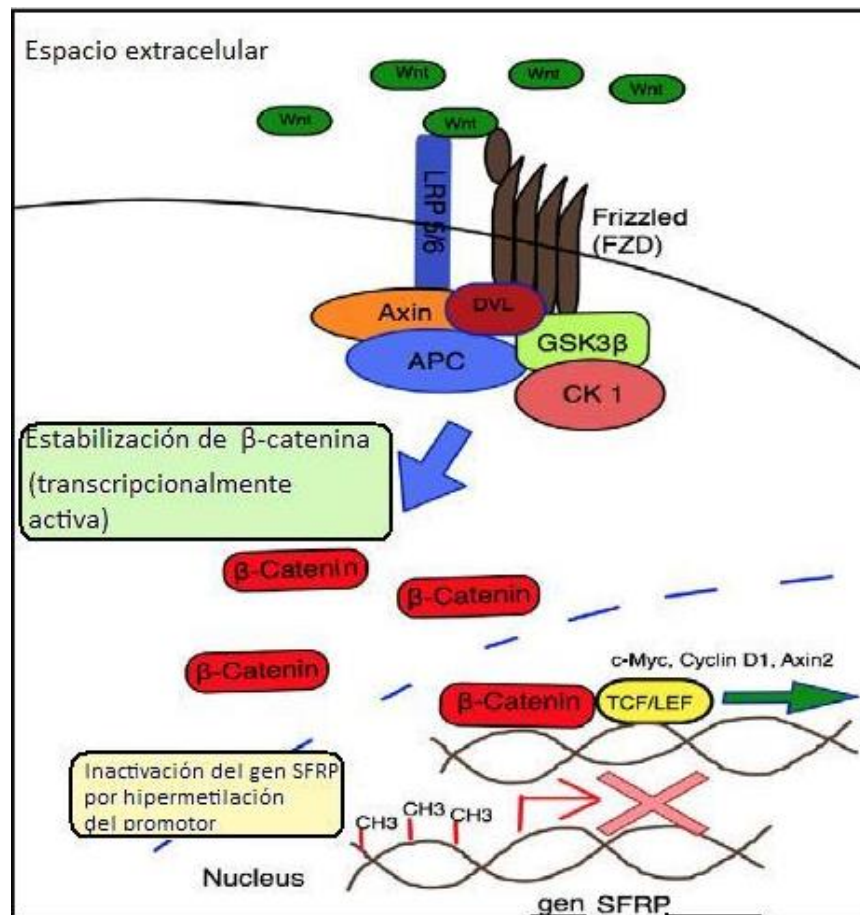


Figura 13.- Hipermetilación de los genes SFRP. Los promotores de los genes SFRP, cuando se encuentran hipermetilados consecuentemente son silenciados, dando como resultado una disminución en la expresión de estos genes y un incremento en la activación de la vía de señalización Wnt. Figura modificada de Surana, y otros, 2014.

Por todo lo anteriormente señalado resulta muy importante y atractivo continuar con las investigaciones pertinentes para conocer más allá los mecanismos que pueden ayudar a regular el comportamiento de estos genes en el tejido óseo, específicamente en el desarrollo del osteoblasto, una de las células fundamentales en la estructura de éste tejido para con ello lograr avanzar en el tratamiento y si es posible en la detección oportuna de una de las patologías que más afectan al antes mencionado, la osteoporosis, causada por una regeneración aberrante del tejido óseo, o en el peor de los casos a la no regeneración del mismo.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el estado de metilación en la región promotora de la familia de genes SFRP mediante PCR de metilación específica (MSP) para precisar su importancia durante el desarrollo del osteoblasto.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la expresión de los genes SFRP1, SFRP2, SFRP4 y SFRP5 a nivel de RNA mensajero en líneas celulares osteoblásticas humanas.
2. Determinar el estado de metilación de los genes SFRP1, SFRP2, SFRP4 y SFRP5 en las líneas celulares hFOB1.19, MG-63 y Saos-2 durante la proliferación y diferenciación osteoblástica.
3. Analizar si existe relación entre el estado de metilación y los cambios de expresión de la familia de genes SFRP.

3. HIPÓTESIS

Dado que la regulación de la expresión de los genes SFRP1, SFRP2, SFRP4 y SFRP5 está fuertemente controlada durante el desarrollo del osteoblasto, es posible que la metilación sea un mecanismo que participa en esta regulación durante el desarrollo de dichas células.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Estrategia experimental

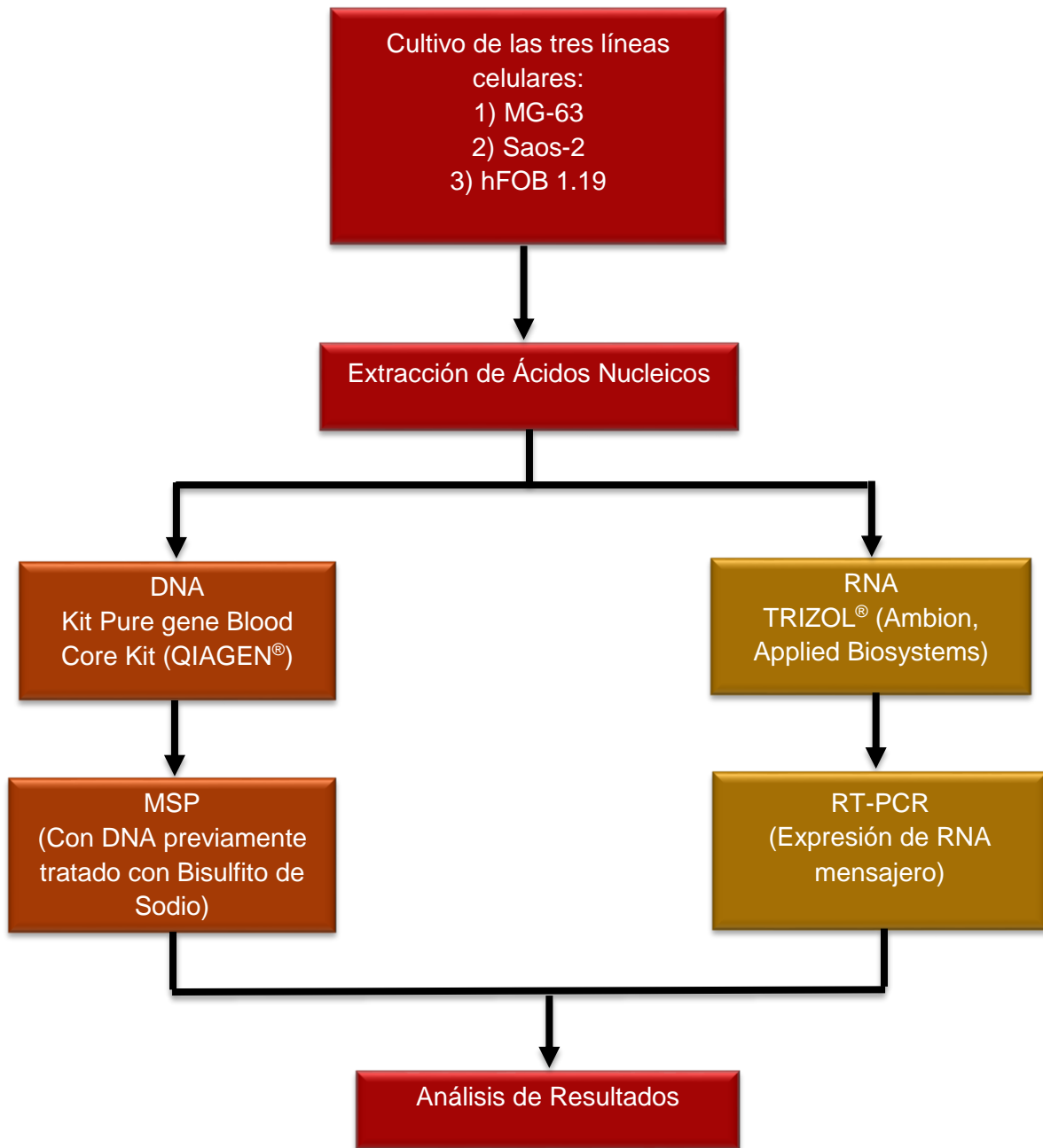


Figura 14.-Diagrama de estrategia experimental del protocolo a seguir. En esta figura se muestra de manera resumida cada uno de los experimentos a realizar en este trabajo.

4.1 EXPERIMENTACIÓN

4.1.1 CULTIVO CELULAR

Para la obtención de las muestras biológicas fue necesario realizar el cultivo de las tres líneas celulares siguientes:

- 1) MG-63
- 2) Saos-2
- 3) hFOB 1.19

Las dos primeras líneas, antes mencionadas, corresponden a células de osteosarcoma, mientras que la tercera, corresponde a una línea normal osteoblástica.

Los cultivos se llevaron a cabo mediante curvas de crecimiento teniendo una duración de 21 días de proliferación, durante ese lapso y tiempos específicos se realizaron cinco cosechas celulares (tanto para extracción de DNA como de RNA total) en los días 3, 8, 15, 18 y 21.

Dichas células fueron distribuidas por American Type Culture Collection (ATCC®). En la tabla 3 se describen las características de cada línea celular y las condiciones de cultivo a seguir según el proveedor.

4.1.2 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La extracción de los ácidos nucleicos fue realizada en los tiempos específicos indicados para el levantamiento celular.

La extracción de DNA se realizó con el Kit Puregene Blood Core Kit (QIAGEN®), mientras que la extracción de RNA total fue realizada con TRIZOL® (Ambion, Applied Biosystems).

Se siguieron las instrucciones indicadas por los proveedores.

La cuantificación se realizó empleando NanoDrop® (Thermo scientific) y la integridad fue evaluada mediante geles de agarosa al 1%.

Tabla 3.- Características y condiciones de cultivo de cada una de las líneas celulares utilizadas en el proyecto

Línea Celular	Características	Medio de Cultivo	Suplementos	Condiciones de incubación y cambios de medio de cultivo
MG-63	Células de osteosarcoma humano de tipo osteoblástico Provenientes de tejido óseo Presentan morfología fibroblástica	Medio Mínimo Esencial Eagle (ATCC®) suplementado al 10% con Suero Fetal Bovino	Después del día 8 de cultivo el medio fue enriquecido con 10mg de ácido ascórbico y 108.5 mg de β-glutamina por cada 100ml de volumen total de medio de cultivo	Los cambios de medio de cultivo se realizaron cada tercer día A una temperatura de 37°C, bajo una atmósfera con 5% de CO2 de incubación
Saos-2	Células de osteosarcoma humano de tipo osteoblástico Provenientes de tejido óseo Presentan morfología epitelial	McCoy's 5ª (ATCC®) suplementado al 15% con Suero Fetal Bovino		
hFOB 1.19	Células osteoblásticas transfectadas con el antígeno T SV40 Provenientes de feto humano	DMEM/F12 (1:1) (1x) (Gibco®) suplementado al 10% con Suero Fetal Bovino		

Información obtenida de los proveedores American Type Culture Collection (ATCC®) para las líneas celulares utilizadas en el proyecto

4.1.3 EXPRESIÓN DE LOS GENES SFRP (SFRP1, SFRP2, SFRP4 Y SFRP5) EN LAS TRES LÍNEAS OSTEOBLÁSTICAS

- 1) Retrotranscripción (RT): A partir del RNA obtenido durante la extracción de ácidos nucleicos se utilizó el Kit Taqman Reverse Transcription (Applied Biosystems) para la síntesis de cDNA, posterior a su obtención, fue cuantificado con NanoDrop® (Thermo scientific).
- 2) Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR): Una vez obtenido el cDNA, se procedió a realizar una PCR tiempo real para calcular la expresión de los genes SFRP1, SFRP2, SFRP4 y SFRP5 en las muestras biológicas. Se utilizó el Kit TaqMan® Universal PCR Master Mix (Roche®). En éste procedimiento se emplearon sondas de hidrólisis Taqman® correspondientes a cada gen analizado, además del gen constitutivo (control endógeno) GAPDH con el cual fueron comparados. Cada experimento se realizó por triplicado para confirmar la reproducibilidad de los resultados.
- 3) Expresión Relativa (ER): Para hacer los cálculos de ER nos apoyamos en el método de “Doble delta Ct ($\Delta\Delta Ct$)” dicho método expresa la proporción obtenida de la relación entre los valores Ct de la muestra y los valores Ct del control endógeno.

4.1.4 EVALUACIÓN DEL ESTADO DE METILACIÓN DE LOS PROMOTORES DE LOS GENES SFRP1, SFRP2, SFRP4 Y SFRP5

- 1) Tratamiento con Bisulfito: El DNA obtenido en la extracción de ácidos nucleicos fue tratado con bisulfito de sodio utilizando el Kit EZ DNA Methylation-Gold™ Kit de la marca comercial ZYMO RESEARCH, siguiéndose las instrucciones del proveedor. Lo que se logra tras dicho procedimiento es la conversión de citosinas a uracilos, las citosinas que se encuentran en 5-meC son resistentes a ésta modificación.
- 2) PCR de metilación específica (MSP): Utilizando el DNA modificado con bisulfito de sodio se realizaron las MSP correspondientes para cada uno de los genes estudiados. Se diseñaron oligos específicos para metilación (M) y no metilación (U) apoyándonos del programa en línea *MethPrimer* (Tollefsbol, 2011). Para la amplificación de los fragmentos correspondientes se utilizó la enzima Amplitaq® Gold DNA Polymerase de AppliedBiosystems; así como también fue necesario agregar DMSO como aditivo estabilizador de la reacción para el par de oligos correspondientes a SFRP1 M. Para cada par de oligos se establecieron condiciones específicas de amplificación, las cuales se enlistan en la tabla 4.
- 3) Se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 3%.

Tabla 4.- Condiciones establecidas para MSP

Oligo	Tamaño (pb)	Secuencia	Tm (°C)	Ciclos
SFRP 1 M	173	MF 5'- GTG TCG CGC GTT CGT TTC GC – 3' MR 5'- AAC GTT ACC CGA CTC CGC GAC CG – 3'	65	33
SFRP 1 U	182	UF 5'- GAG TTA GTG TTG TGT GTT TTG T – 3' UR 5'- CCC AAC ATT ACC CAA CTC CAC AACCA– 3'	49	35
SFRP 2 M	136	MF 5'- GGG TCG GAG TTT TTC GGA GTT GCG C – 3' MR 5'- CCG CTC TCT TCG CTA AAT ACG ACT CG – 3'	54	40
SFRP 2 U	142	UF 5'- TTT TGG GTT GGA GTT TTT TGG AGT TGT GT -3' UR 5'- AAC CCA CTC TCT TCA CTA AAT ACA ACT CA-3'	54	40
SFRP 4 M	112	MF 5'- GGG TGA TGT TAT CGT TTT TGT ATC GAC -3' MR 5'- CCT CCC CTA ACG TAA ACT CGA AAC G -3'	54	40
SFRP 4 U	116	UF 5'- GGG GGT GAT GTT ATT GTT TTT GTA TTG AT- 3' UR 5'- CAC CTC CCC TAA CAT AAA CTC AAA ACA-3'	54	40
SFRP 5 M	136	MF 5'- AAG ATT TGG CGT TGG GCG GGA CGT TC-3' MR 5'- ACT CCA ACC CGA ACC YCG CCG TAC G -3'	54	40
SFRP 5 U	141	UF 5'- GTC AGA TTT GGT GTT GGG TGG GAT GTT T- 3' UR 5'- AAA ACT CCA ACC CAA ACC TCA CCA TAC A- 3'	54	40

5. RESULTADOS

5.1 GEN SFRP1

5.1.1 EXPRESIÓN RELATIVA DE SFRP1

El gen SFRP1 se expresa en todas las líneas celulares, con mayor incidencia en la línea celular hFOB 1.19 denotando un incremento en su expresión conforme van transcurriendo los días de proliferación (figura 15). En las líneas celulares Saos-2 y MG-63 también hay expresión del gen; en ambas líneas celulares se observa que en el día 18 de proliferación la expresión del gen fue más alta, sin embargo, tiende a disminuir hacia el día 21. Comparando la expresión del gen en las líneas celulares Saos-2 y MG-63 existe una diferencia significativa con respecto a la línea celular hFOB 1.19 (figura 15).

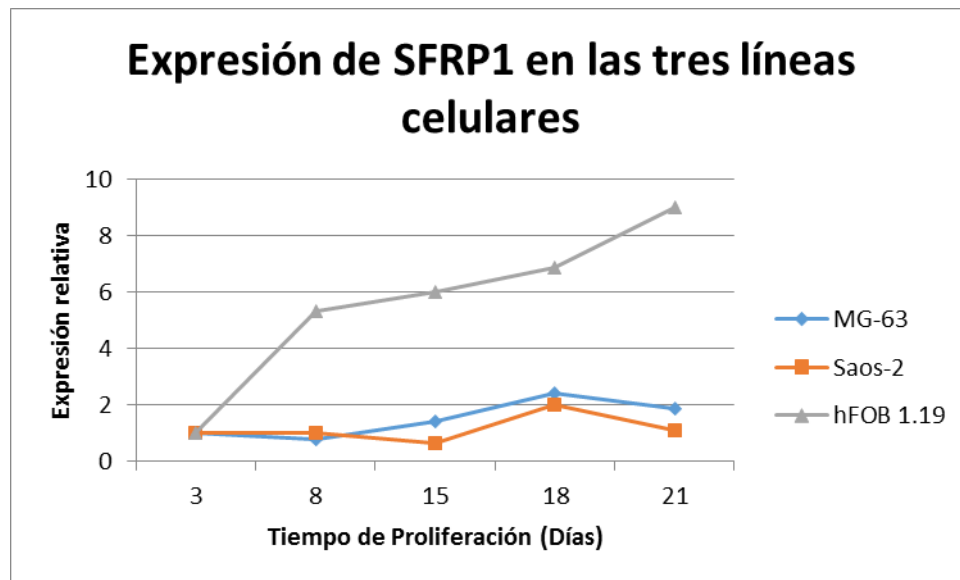


Figura 15.-Expresión relativa del gen SFRP1 en las tres líneas celulares osteoblásticas. Se observa una diferencia significativa en la expresión de SFRP1 en la línea celular hFOB 1.19 con respecto a Saos-2 y a MG-63. El comportamiento de la expresión del gen en las dos líneas celulares previamente mencionadas, es muy similar.

5.1.2 METILACIÓN DE SFRP1

Se encontraron tres CGI localizadas en la región promotora de SFRP1 y el exón 1. Los oligonucleótidos se diseñaron en regiones cercanas al sitio del inicio de la transcripción en el exón 1 (figura 16A). La región promotora de SFRP1 se encuentra desmetilada en las líneas celulares MG-63 y Saos-2 (figura 16B). En el caso de hFOB 1.19, la región promotora del gen se encuentra metilada, presentando una disminución en la metilación conforme va transcurriendo el tiempo de proliferación (figura 16B).

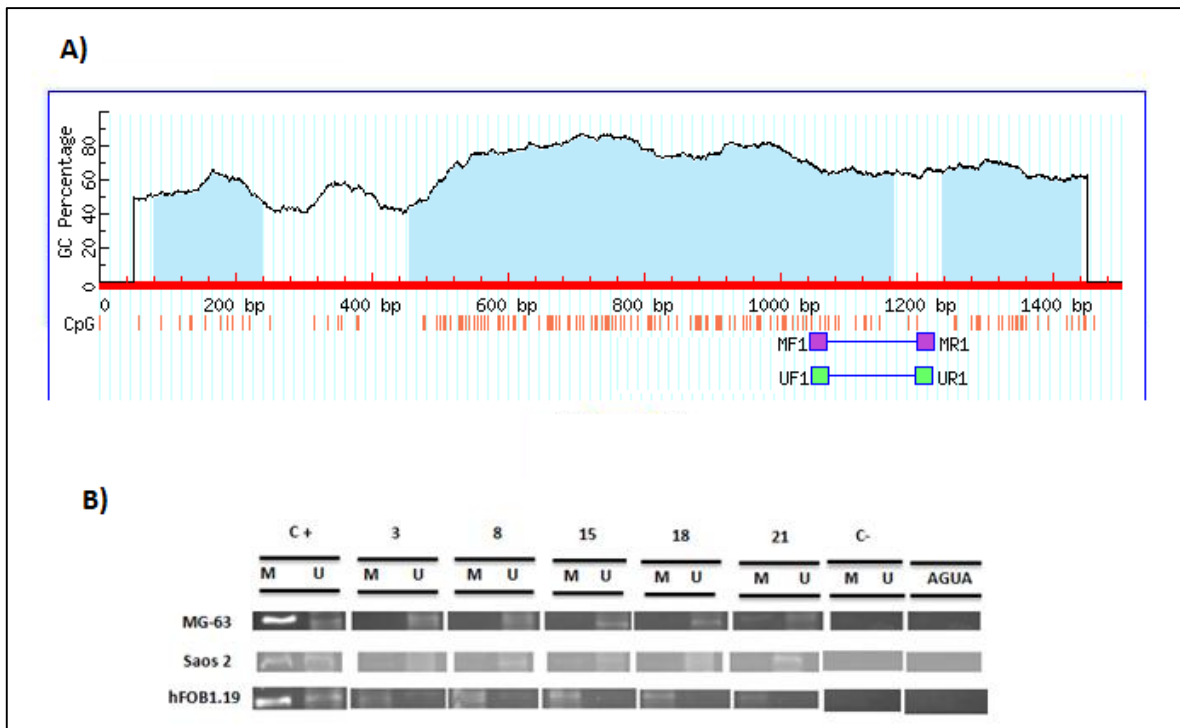


Figura 16.- Estado de metilación del gen SFRP1. A) Análisis de CGI (Islas CG, por sus siglas en inglés) para la región promotora de SFRP1. Los oligonucleótidos para la PCR sensible a Metilación (MSP) amplifican una región en el exón 1, en morado se muestran los que amplifican el fragmento metilado (MF/MR), y en verde los que amplifican en fragmento no metilado (UF/UR). **B) Análisis de metilación de la región promotora de SFRP1 por MSP.** La presencia de la banda clara en cada uno de los segmentos correspondientes a los días de proliferación representan el producto de PCR obtenido: en donde U corresponde al fragmento no metilado, M corresponde al fragmento metilado, C+ control positivo y C- control negativo.

5.2 GEN SFRP2

5.2.1 EXPRESIÓN RELATIVA DE SFRP2

El gen SFRP2 se expresa en todas las líneas celulares. La expresión del gen en MG-63 y Saos-2 es muy similar, sin embargo, se observa una mayor expresión en Saos-2 que en MG-63 (figura 17). En la línea celular hFOB 1.19 se observa una ligera disminución en la expresión del gen del día 3 al día 8 de proliferación; en el día 15 se observa el incremento más significativo de la expresión del gen, sin embargo, conforme transcurren los días de proliferación se observa un declive en la expresión del gen SFRP2 (del día 15 al día 21) (figura 17).

5.2.2 METILACIÓN SFRP2

En la región promotora de SFRP2 se encontraron dos CGI; una antes del exón 1 y la segunda en el exón 1. Los oligonucleótidos se diseñaron en el exón 1 antes del sitio de inicio de la transcripción (figura 18A). El gen SFRP2 se encuentra metilado en las tres líneas celulares; el estado de metilación se mantiene constante a lo largo de los días de proliferación en las líneas celulares Saos-2 y hFOB 1.19 (figura 18B), sin embargo, en MG-63 hay mayor proporción del alelo metilado en los días 15 y 21. También hay amplificación del alelo no metilado en las tres líneas celulares (figura 18B).

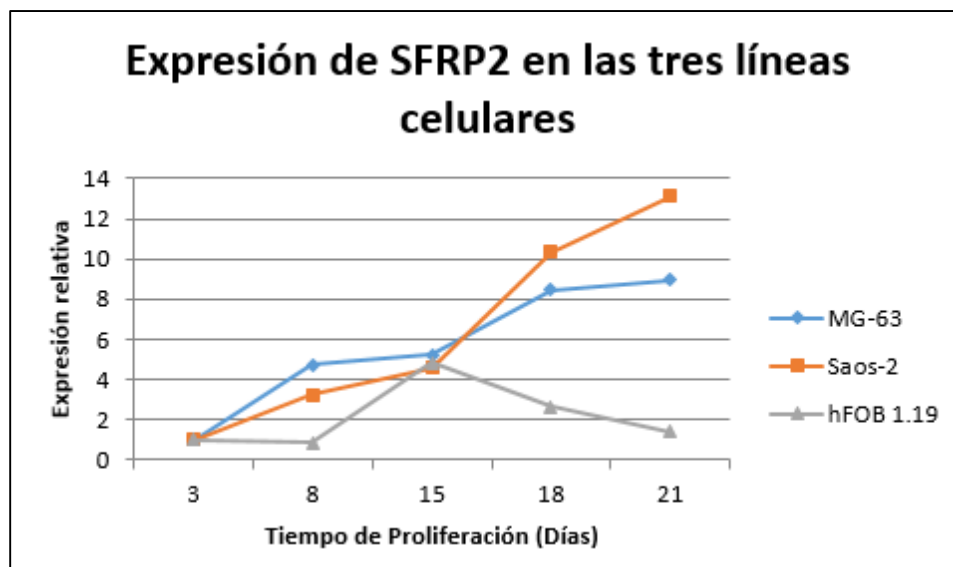


Figura 17.- Expresión relativa del gen SFRP2 en las tres líneas celulares osteoblásticas. El gen SFRP2 se expresa en las tres líneas celulares osteoblásticas, presenta un comportamiento ligeramente similar en las líneas MG-63 y Saos-2. En el caso de la línea celular hFOB 1.19 no presenta una expresión en incremento y mucho menos constante, el incremento más notorio en la expresión se denota en el día 15 de proliferación.

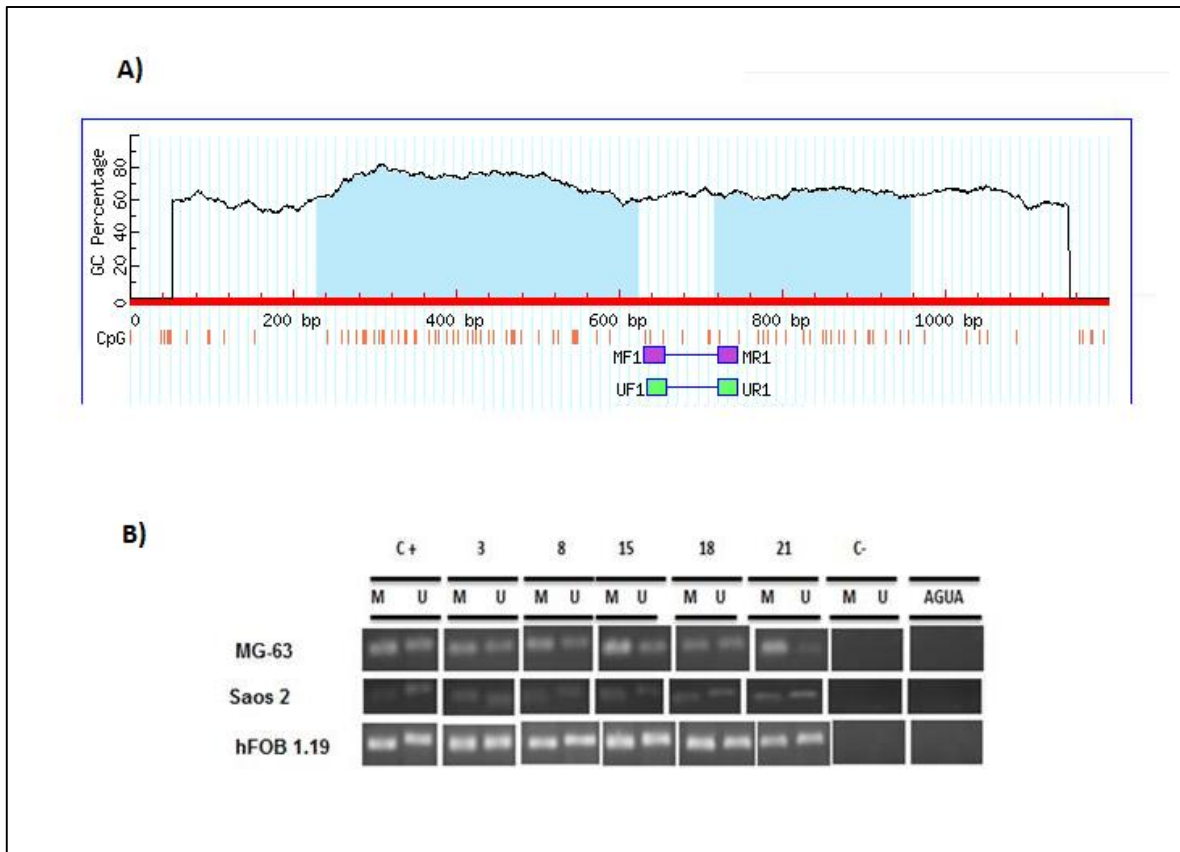


Figura 18.-Estado de metilación del gen SFRP2. A) Análisis de CGI para la región promotora de SFRP2. Los oligonucleótidos para la PCR Sensible a Metilación (MSP) amplifican una región en el exón 1, en morado se muestran los que amplifican el fragmento metilado (MF/MR) y en verde los que amplifican el fragmento no metilado (UF/UR). **B) Análisis de metilación de la región promotora de SFRP2 por MSP.** La presencia de la banda clara en cada uno de los segmentos correspondientes a los días de proliferación representan el producto de PCR obtenido: en donde U corresponde al fragmento no metilado, M corresponde al fragmento metilado, C+ control positivo y C- control negativo.

5.3 GEN SFRP4

5.3.1 EXPRESIÓN RELATIVA DE SFRP4

La expresión del gen SFRP4 se observa claramente en la línea celular Saos-2, incrementa conforme van transcurriendo los días de proliferación (figura 19). En el caso de la línea celular MG-63 la expresión de éste gen se ve demasiado débil comparada con la expresión observada en Saos-2, el comportamiento de la tendencia de expresión del gen es completamente lineal del día 3 al día 18 de proliferación, del día 18 al día 21 se observa un ligero incremento en su expresión (figura 19). La expresión de SFRP4 en la línea celular hFOB 1.19 se mantiene con una tendencia lineal, con una ligera apariencia de incremento en el día 15, pese a esto se observa, una expresión muy débil (figura 19).

5.3.2 METILACIÓN DE SFRP4

No se encontraron CGI en la región promotora de SFRP4 cercanas al sitio de inicio de la transcripción, se encontró una isla CpG en el exón 3, por lo tanto, los oligonucleótidos se diseñaron en esa región (figura 20A). El gen SFRP4 se encuentra metilado en las tres líneas celulares, sin embargo, también hay amplificación del alelo no metilado. Se observa una mayor proporción del alelo no metilado en MG-63 y en hFOB 1.19, conforme transcurren los días de proliferación se distingue una disminución del estado de metilación y un aumento en la proporción del alelo no metilado en ambas líneas celulares; mientras que en Saos-2 no se aprecia diferencia alguna en la proporción de ambos alelos (figura 20B).

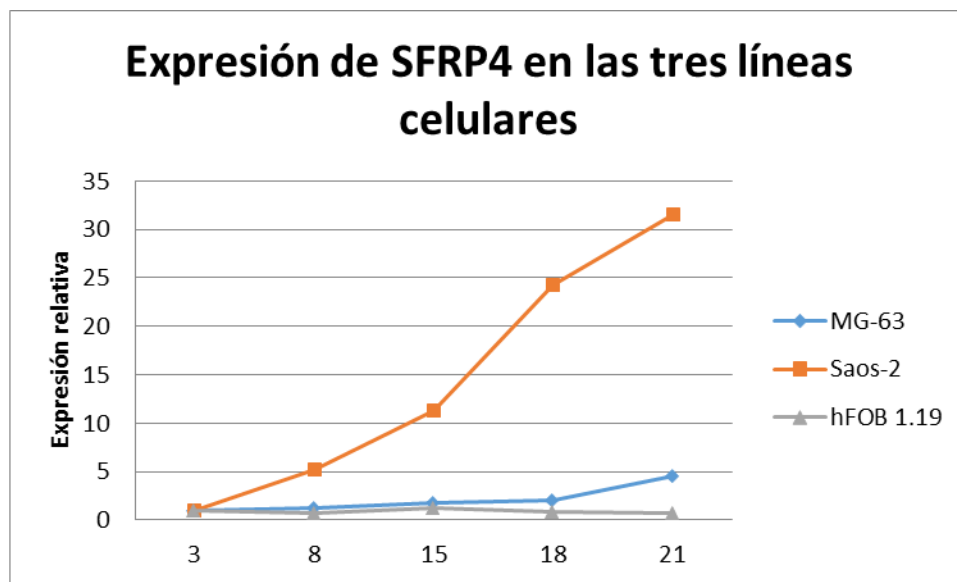


Figura 19.-Expresión relativa del gen SFRP4 en las tres líneas celulares osteoblásticas. La expresión de SFRP4 se encuentra incrementada y visiblemente acentuada en la línea celular Saos-2, en la que va incrementando conforme transcurren los días de proliferación. En el caso de MG-63 y hFOB 1.19 la expresión de SFRP4 es demasiado débil.

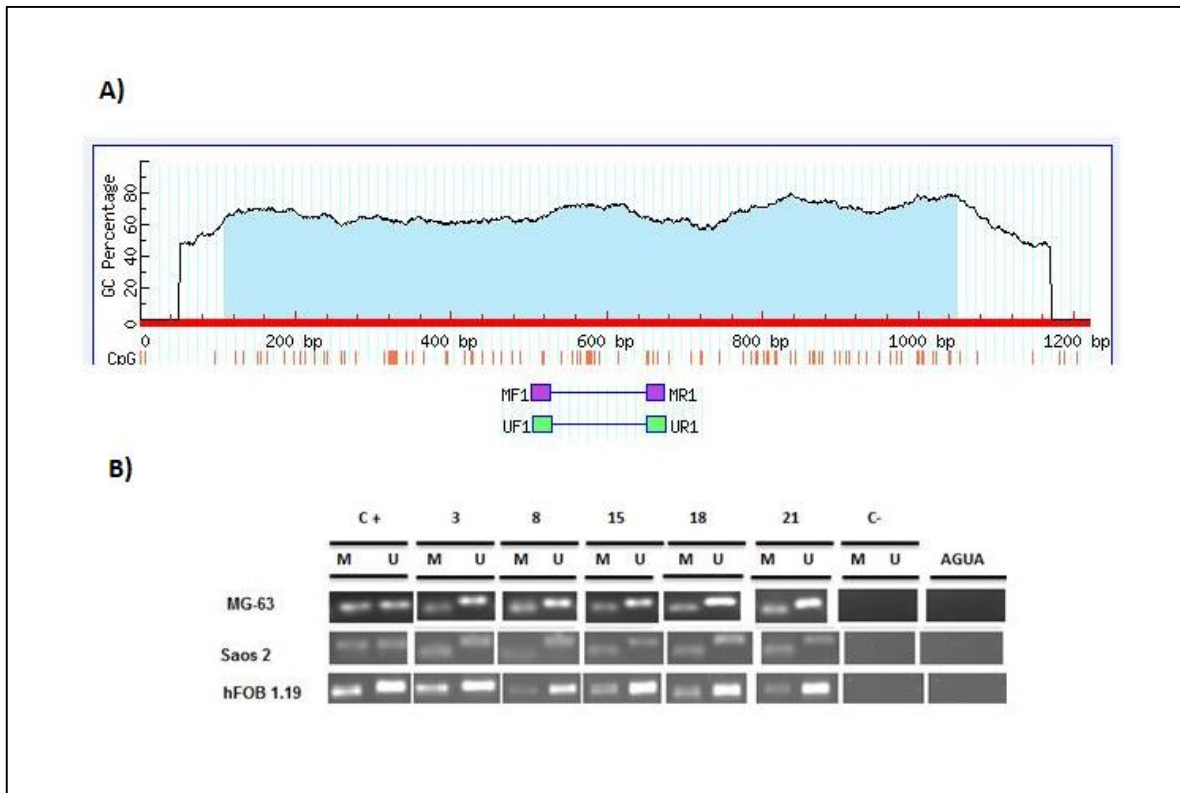


Figura 20.- Estado de metilación del gen SFRP4. A) Análisis de CGI para la región promotora de SFRP4. Los oligonucleótidos para la PCR Sensible a Metilación (MSP) amplifican una región en el exón 3, en morado se muestran los que amplifican el fragmento metilado (MF/MR) y en verde los que amplifican el fragmento no metilado (UF/UR). **B) Análisis de metilación de la región promotora de SFRP4 por MSP.** La presencia de la banda clara en cada uno de los segmentos correspondientes a los días de proliferación representan el producto de PCR obtenido: en donde U corresponde al fragmento no metilado, M corresponde al fragmento metilado, C+ control positivo y C- control negativo.

5.4 GEN SFRP5

5.4.1 EXPRESIÓN RELATIVA DE SFRP5

El gen SFRP5 no se expresa en ninguna de las tres líneas celulares osteoblásticas.

5.4.2 METILACIÓN DE SFRP5

Se encontró una CGI que abarca la región promotora y parte del exón 1 del gen SFRP5, los oligonucleótidos se diseñaron en una región río arriba del inicio del exón 1 (figura 21A). En las tres líneas celulares hay amplificación de ambos alelos, metilados y no metilados. En la línea celular Saos-2 el alelo no metilado se observa en mayor proporción que el alelo metilado. En las otras dos líneas celulares ambos alelos se encuentran en una misma proporción (figura 21B).

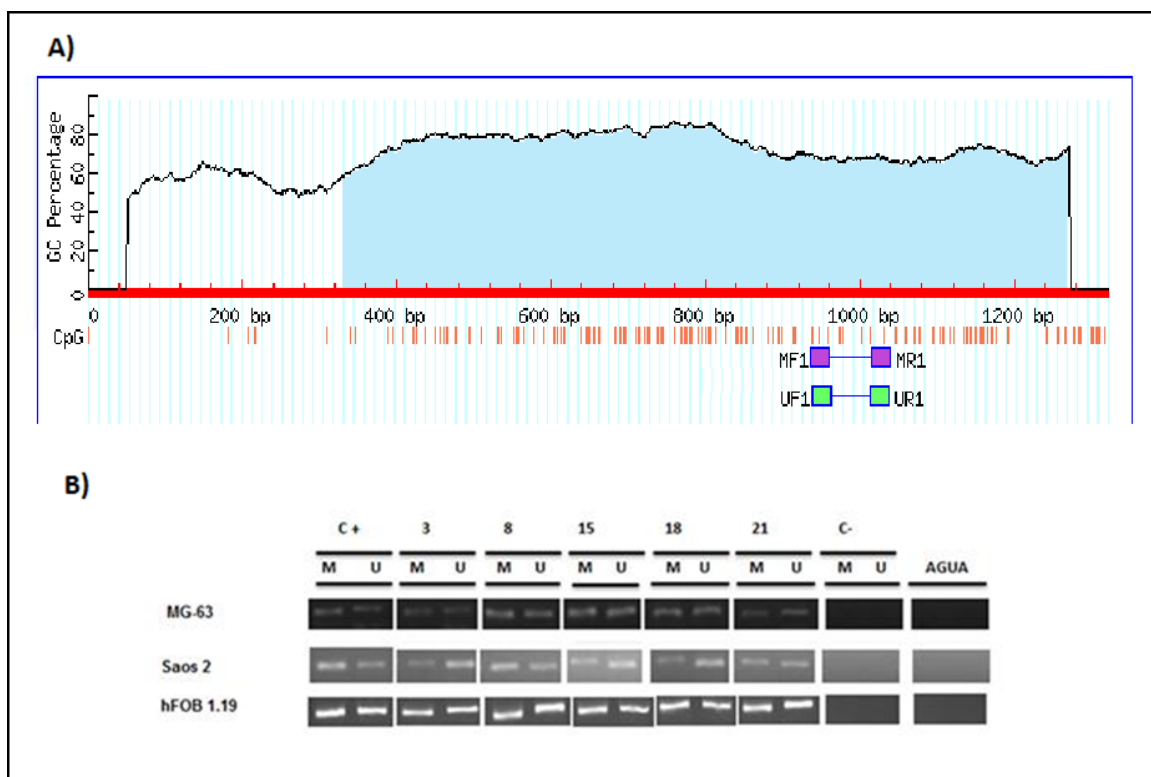


Figura 21.-Estado de metilación del gen SFRP5. A) Análisis de CGI para la región promotora del gen SFRP5. Los oligonucleótidos para la PCR Sensible a Metilación (MSP) amplifican una región en el exón 1, en morado se muestran los que amplifican el fragmento metilado (MF/MR) y en verde los que amplifican el fragmento no metilado (UF/UR). **B) Análisis de metilación de la región promotora de SFRP5 por MSP.** La presencia de la banda clara en cada uno de los segmentos correspondientes a los días de proliferación representan el producto de PCR obtenido: en donde U corresponde al fragmento no metilado, M corresponde al fragmento metilado, C+ control positivo y C- control negativo.

En las tablas 5 y 6 se condensan los resultados de expresión y metilación de los genes SFRP en las tres líneas celulares osteoblásticas.

Tabla 5.- Expresión Relativa de los genes SFRP en las tres líneas celulares osteoblásticas.

Gen	Líneas Celulares Osteoblásticas			Observaciones
	MG-63	Saos-2	hFOB 1.19	
SFRP1	+	+	+	El comportamiento de la expresión del gen en hFOB 1.19 se observa todo el tiempo en incremento a medida que transcurren los días de cultivo, mientras que en las otras dos líneas celulares el comportamiento es similar pero se observa una diferencia muy marcada en comparación con la línea celular hFOB 1.19
SFRP2	+	+	+	En hFOB 1.19 presenta un descenso en su expresión a partir del día 15 al día 21 de proliferación
SFRP4	+	+	+	La expresión en MG-63 y en hFOB1.19 es demasiado débil. En MG-63 se observa un ligero incremento de su expresión a partir del día 18 al 21 de proliferación.
SFRP5	-	-	-	No hubo expresión del gen en ninguna de las tres líneas celulares

(+) El gen se expresa; (-) El gen no se expresa

Tabla 6.- Estado de metilación del promotor de los genes SFRP en las tres líneas celulares osteoblásticas.

Gen	Líneas Celulares Osteoblásticas			Observaciones
	MG-63	Saos-2	hFOB 1.19	
SFRP1	U	U	M	Amplificación del alelo metilado en hFOB 1.19 mientras que en el caso de MG-63 y Saos-2 no hubo amplificación de este alelo.
SFRP2	M/U	M/U	M/U	Mayor proporción del alelo M en los días 15 y 21 de proliferación en MG-63.
SFRP4	M/U	M/U	M/U	Mayor proporción del alelo U en MG-63 y en hFOB 1.19.
SFRP5	M/U	M/U	M/U	Mayor proporción del alelo U en Saos-2.

M: Metilado; U: No Metilado

6. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para hacer el estudio de los genes mencionados en este proyecto, se emplearon tres modelos celulares de experimentación diferentes: las líneas celulares Saos-2 y MG-63 (derivadas de osteosarcoma) y la línea celular hFOB 1.19 (de origen fetal).

Los osteosarcomas son tumores malignos de hueso, que se encuentran formados por células con funciones celulares anormales. Las células derivadas de osteosarcoma son comúnmente utilizadas como modelos osteoblásticos (Pautke, y otros, 2004).

Las células hFOB1.19 constituyen una línea celular normal osteoblástica de feto humano, derivado de un aborto espontáneo. Se sabe que estas células tienen una elevada actividad de fosfatasa alcalina (ALP) (Salles, Dos Santos, Campanelli, Martins, Sogayar, & Granjeiro, 2008). Estas células han sido empleadas como adecuados modelos para el estudio de biocompatibilidad y procesos de formación ósea (Harris, Enger, Riggs, & Spelberg, 1995); pueden sintetizar y mineralizar la matriz ósea, expresar marcadores osteoblásticos tales como RUNX2 y BMP2 (Guo, Li, Lv, Wei, Cao, & Gu), además de formar hueso *in vivo* sin sufrir alguna transformación celular.

Es por esto que los modelos celulares anteriormente mencionados fueron utilizados de la siguiente manera tomando en cuenta sus características:

- MG-63: modelo de proliferación
- Saos-2: modelo de diferenciación
- hFOB 1.19: modelo normal osteoblástico

6.1 SFRP1: EXPRESIÓN Y METILACIÓN

La expresión del gen se observó en las tres líneas celulares con una tendencia al aumento conforme pasan los días de cultivo, sin embargo, es importante señalar que se ve más incrementada en la línea celular hFOB 1.19, siendo su punto de expresión más alto en el T21. En las otras dos líneas celulares se podría decir que prácticamente el comportamiento de expresión del gen es el mismo, no obstante, su expresión se observa ligeramente superior en MG-63 con respecto a Saos-2; lo que sí es evidente es que en el tiempo 18 se encuentra el punto de expresión más alto para luego disminuir hacia el tiempo 21.

Los resultados del estudio de metilación del DNA en la región promotora del gen indican que en las líneas celulares MG-63 y Saos-2 se encuentra desmetilada, por lo que se puede justificar la expresión del gen en estos dos modelos celulares.

Sin embargo, en un estudio realizado por García-Ibarba y colaboradores, con la finalidad de explorar la relación existente entre el estado de metilación del DNA y la expresión de genes relacionados con Wnt, trataron células MG-63 durante 4 días con 5'-aza-2deoxi-azacitidina (5-aza-dCyd), el cual actúa de forma generalizada como agente desmetilante. En las células tratadas con 5-aza-dCyd, 16 genes mostraron un decremento en su estado de metilación (evaluado previamente al tratamiento), entre los que se encontraba el gen SFRP1 (García-Ibarba, y otros, 2013). Resultando un tanto controversial al obtenido en este proyecto.

En el caso de la línea celular hFOB 1.19 los resultados indican que la región promotora se encuentra metilada pese a que exista una disminución evidente del estado de metilación conforme transcurre el tiempo de proliferación. Analizando estos resultados en conjunto con los de expresión nos damos cuenta de que efectivamente la metilación podría ser un mecanismo que posiblemente participe en el control de su expresión ya que conforme va disminuyendo la metilación del gen su expresión va en aumento.

En un estudio realizado con anterioridad se demostró que el incremento de la expresión de SFRP1 está relacionado con la elevada muerte celular, mientras que el decremento de la misma, con la disminución de su mortalidad. Además de que la sobreexpresión de SFRP1 acelera la muerte celular de HOB (osteoblastos humanos) y antagoniza la vía de señalización Wnt canónica (Bodine, y otros, 2005).

En líneas celulares de HOB, los niveles de RNAm de SFRP1 incrementan con el avance de la diferenciación celular alcanzando su pico más alto en el estadio de preosteocito durante su desarrollo (Bodine, y otros, 2005). Relacionando estos resultados con los obtenidos en este proyecto, nos podemos dar cuenta de que en el T21 se lleva a cabo el punto de expresión más alto en la línea celular hFOB 1.19, siendo el T21 el fin de la diferenciación osteoblástica dando paso, en teoría al proceso de mineralización en donde el osteoblasto ya se encuentra en su etapa de osteocito.

Sin embargo, más tarde Trevant y colaboradores, en su investigación realizada en ratones SFRP1-LacZ knock-in (SFRP1^{-/-}) demostraron que la pérdida de la función de SFRP1, no tiene consecuencias en el desarrollo embrionario normal y tampoco en el crecimiento postnatal. Es importante destacar que sus resultados muestran que SFRP1 se expresa transitoriamente en las células del esqueleto durante el desarrollo embrionario y después del nacimiento, además de establecer que la inhibición de SFRP1 tiene un leve efecto anabólico en el hueso y en la diferenciación del osteoblasto (Trevant, Gaur, Hussain, Symons, Komm, & Lian, 2008). Si extrapolamos estos resultados a los obtenidos en este estudio, podemos ver una

relación con lo argumentado por parte de Trevant y su equipo, ya que en la línea celular hFOB 1.19 es en donde se observa más incrementada la expresión del gen SFRP1 siendo que esta línea celular es de origen fetal.

Por otra parte, la actividad de SFRP1 afecta algunos aspectos en la formación de hueso y cartílago; y consecuentemente alteraciones en su expresión o función provoca desordenes en estos dos tejidos. Ensayos *in vitro*, demostraron que SFRP1 inhibe la formación de osteoclastos, mientras que la inactivación del gen SFRP1 acelera la diferenciación de condrocitos y el proceso de osificación endocondral, así como también la formación de hueso trabecular en animales de edad avanzada. Este último defecto es el resultado de un proceso de proliferación y diferenciación aumentados en el osteoblasto, asociados con una lenta pérdida de masa ósea causada por la disminución del proceso apoptótico de los osteoblastos y osteocitos (Esteve & Bovolenta, 2010).

Yao y colaboradores en su investigación, encontraron que la sobreexpresión sistémica de SFRP1 disminuye la vía de señalización Wnt canónica en tejido óseo además de inhibir la proliferación celular en médula y la diferenciación osteogénica resultando en una baja maduración y función osteoblástica provocando, una disminución en la formación ósea (Yao, Cheng, Shahnazar, Dai, Johnson, & Lane, 2010).

Otro estudio realizado en humanos confirma los resultados obtenidos en estudios realizados en animales dejando en evidencia el papel del gen SFRP1 en el tejido óseo, dicho estudio fue llevado a cabo en dos grupos de mujeres uno de ellos conformado por mujeres jóvenes (22-40 años) y el segundo conformado por mujeres de edad avanzada (64-88 años); demostró que en las biopsias analizadas de ambos grupos hubo mayor incidencia de la expresión del gen SFRP1 así como también una concentración elevada de la proteína SFRP1 en suero, sugiriendo que puede haber una relación en la expresión de este gen con la pérdida de masa ósea por cuestiones de edad, provocando problemas de osteoporosis o riesgos elevados de fractura (Roforth, y otros, 2014).

6.2 SFRP2: EXPRESIÓN Y METILACIÓN

En las tres líneas celulares hay expresión del gen, sin embargo, al observar el comportamiento de expresión en los modelos celulares de osteosarcoma (Saos-2 y MG-63) se podría decir que es el mismo, habiendo una ligera diferencia entre ambas, ya que en la línea celular Saos-2 la expresión se ve ligeramente aumentada. En el caso de la línea celular hFOB 1.19 también se observa expresión del gen, pero con un comportamiento totalmente diferente a los anteriormente mencionados ya que la expresión es menor y a partir del tiempo 15 (que es el pico más alto de expresión) se observa un descenso de la misma en los tiempos restantes de proliferación.

En los resultados de metilación de la región promotora del gen SFRP2 se puede observar que se encuentra metilado en los tres modelos celulares por lo que se puede decir que el estado de metilación no está relacionado con el control de la expresión del gen durante el desarrollo de los procesos de diferenciación y proliferación del osteoblasto, sin embargo al observar la tendencia de disminución de la expresión del gen en la línea celular hFOB 1.19 a partir del tiempo 15 se puede sugerir que la metilación podría estar involucrada en el control de su expresión en un proceso normal de desarrollo del osteoblasto.

En una investigación reciente, estudiaron los niveles de expresión de SFRP2 en varias líneas celulares de osteosarcoma. Encontraron que el RNAm de SFRP2 se encontraba disminuido y la metilación del gen significativamente incrementada en tumores malignos de osteosarcoma, en comparación con el tejido sano adyacente. Además, la expresión de SFRP2 se encontraba significativamente reducida en las líneas celulares de osteosarcoma Saos-2, MG-63 y U2OS. La desmetilación del gen SFRP2 por medio de 5'-aza-deoxicitidina (5-aza-dCyd) en las líneas celulares de osteosarcoma permitieron la restauración de la expresión de SFRP2, y con ello, la invasión celular fue suprimida. Además, la desmetilación del gen SFRP2, aparentemente inhibe la acumulación nuclear de β -catenina, factor importante de la señalización Wnt, en líneas celulares de osteosarcoma. Estos datos en conjunto, sugieren que SFRP2 puede actuar como supresor de tumores debido a su interferencia en la señalización Wnt, y la metilación del gen SFRP2 promueve la patogénesis del osteosarcoma (Xiao, Yang, Zhang, & An, 2016).

Estos resultados coinciden con los obtenidos en este proyecto, tanto en la línea celular Saos-2 como en MG-63 en los que la expresión del gen SFRP2 se encuentra más incrementada en comparación con la línea celular hFOB 1.19, además de que si comparamos las proporciones de los alelos metilados de las tres líneas celulares estudiadas, nos damos cuenta de que en el caso de la línea celular hFOB 1.19 la

proporción de este alelo es mayor a lo observado en las otras dos líneas celulares de osteosarcoma; lo que nos lleva a pensar, que efectivamente en un proceso normal de formación ósea este gen se encuentra fuertemente controlado, de lo contrario, traería consigo consecuencias negativas en este proceso, por lo que en este caso la metilación juega un papel muy importante en el desarrollo del osteoblasto.

En otro estudio realizado con anterioridad, también ponen de manifiesto el papel que juega el gen SFRP2 en células mesenquimales humanas (hMSC) (de las cuales se deriva el linaje osteoblástico) en cultivo celular bajo condiciones de estrés oxidativo, demostrando que la sobreexpresión del gen SFRP2 mejora la supervivencia de estas células sin afectar sus características en cuanto a morfología, a la expresión de marcadores de superficie y a su potencial de proliferación; teniendo un efecto citoprotector (Pomduk, Kheolamai, U-Pratya, Wattanapanitch, Klincomhon, & Issaragrisil, 2015).

6.3 SFRP4: EXPRESIÓN Y METILACIÓN

Los resultados de expresión indican que el gen SFRP4 se expresa fuertemente en la línea celular Saos-2, caso contrario a las líneas celulares hFOB 1.19 y MG-63 en las que la expresión del gen se observa muy debilitada, aunque, en el caso de MG-63 se logre observar un ligero incremento de la misma en el tiempo 21.

En cuanto al estado de metilación del gen en las tres líneas celulares, los resultados nos indican que la región seleccionada para su evaluación se encuentra metilada aun habiendo presencia del alelo no metilado. Tomando como premisa estos resultados y relacionándolos con los de expresión, podríamos sugerir que efectivamente la metilación juega un papel importante en la regulación de este gen durante el desarrollo del osteoblasto en las líneas celulares hFOB1.19 y MG-63, mientras que en Saos-2 a pesar de denotar metilación, éste gen se sigue expresando y de una forma ascendente conforme transcurre el tiempo de desarrollo, lo que sugiere que la metilación en esa línea celular no juega un papel regulador en la expresión de este gen.

Sin embargo, en un estudio realizado en células de ratón ST2 derivadas de células troncales de origen estromal de médula ósea, sometidas a un ambiente de estrés oxidativo, sugiere que la expresión de este gen es controlada mediante el mecanismo epigenético de metilación, ya que observaron que el estrés oxidativo des-reprime la expresión de SFRP4, viéndose reflejado en la reducción de la masa ósea mientras que la expresión del gen aumentaba. También observaron que los

sitios CpG no se encuentran alrededor de la región promotora del gen y la metilación evaluada frecuentemente por MSP, es mucho menor que la evaluada en otros SFRPs (Mori, y otros, 2014).

Lo mencionado en el párrafo anterior sustenta los resultados obtenidos en este proyecto, ya que el alelo no metilado se observa en una proporción más alta que la del alelo metilado, además de que comparando la metilación de SFRP4 con la de SFRP2, también evaluados en este estudio, se observa en una forma más tenue.

En diversos estudios realizados con anterioridad se ha demostrado que *in vitro* este gen exhibe un efecto supresor en la proliferación de osteoblastos debido a la inhibición de la vía Wnt β -catenina, sin embargo, en modelos animales, ha quedado demostrado el papel que juega el gen SFRP4 en el desarrollo del tejido óseo; uno de ellos realizado *in vivo* en ratones transgénicos SFRP4 GT en los que el gen SFRP4 se encontraba sobre expresado en las células osteoblásticas, demostró que la sobreexpresión de este gen provoca un decremento evidente en la masa ósea así como también, suprime la formación de hueso (Nakanishi, y otros, 2008).

Finalmente en un estudio publicado en este año, en el cual generaron una cepa de ratones knock-in SFRP4^{LacZ} teniendo como finalidad explorar el impacto fisiológico de SFRP4 durante el desarrollo y la homeostasis del hueso, reafirmaron que dicho gen es un regulador negativo de la vía de señalización Wnt ya que al analizar esta cepa de ratones observaron que el sistema de modulación de la señalización Wnt mediada por SFRP4 tiene un profundo impacto en el desarrollo del esqueleto post-natal y durante el proceso de mantenimiento del hueso en edad adulta, además de que la acumulación excesiva de este gen, se encuentra relacionada con la pérdida de tejido óseo, especulando que se puede atribuir a la inactivación osteoblástica durante el envejecimiento (Haraguchi y otros, 2016).

6.4 SFRP5: EXPRESIÓN Y METILACIÓN

No hay expresión de SFRP5 en ninguna de las tres líneas celulares lo que sugiere al relacionar este resultado con los de metilación, que efectivamente la expresión del gen se encuentra fuertemente regulada por este mecanismo epigenético ya que en los resultados de metilación se observa que el gen se encuentra metilado en las tres líneas celulares estudiadas. El resultado obtenido en este estudio se asemeja con lo reportado en la literatura del cáncer, ya que indica que la metilación y la inactivación del gen SFRP5 se asocia con diversos tipos de cáncer, tales como gástrico, ovario, mama y renal, así como también, leucemia mieloide. Sin embargo, no hay estudios previos en los que se reporte la intervención de SFRP5 en el tejido

óseo, lo que justifica, en cierto modo el hecho de no haber sido cuantificada la expresión de dicho gen en alguna de las líneas celulares osteoblásticas humanas analizadas en este estudio. No obstante, este gen presenta injerencia en otros tipos de tejidos tales como tejido adiposo, en el que un estudio realizado por Mori y colaboradores, con la finalidad de estudiar la biología del tejido adiposo blanco, encontraron que la expresión del gen SFRP5 a nivel de RNAm se encuentra fuertemente inducido en dicho tejido, además de presentar un incremento en los niveles de la proteína SFRP5 (Mori, y otros, 2012).

Otra evidencia de la acción de SFRP5 en tejido adiposo fue reportada en un estudio más reciente realizado en adipocitos de origen humano, en el que observaron que es capaz de inhibir la acción de la insulina en cultivo celular primario bajo condiciones basales (Carstensen, y otros, 2014).

Finalmente es importante señalar que tomando en conjunto los resultados obtenidos en este proyecto con los reportados en investigaciones anteriores, queda evidente que la expresión de los genes SFRP se encuentra fuertemente regulada durante el desarrollo del osteoblasto, de lo contrario, la sobreexpresión de estos genes puede conducir a patologías óseas, tales como la osteoporosis. Sin embargo, para poder tener un argumento más a nuestro favor en la corroboración de los resultados obtenidos, hubiese sido oportuno hacer pruebas con agentes desmetilantes como lo es la 5'-aza-deoxicitidina (5-aza-dCyd) para observar el comportamiento del gen después del proceso de desmetilación.

7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este proyecto demostraron que los genes SFRP1, SFRP2 y SFRP4 se expresan en las tres líneas celulares osteoblásticas humanas empleadas como modelos de experimentación; en el caso del gen SFRP5 los resultados indicaron que no se expresa en ninguna de las tres líneas celulares.

Al evaluar el estado de metilación de los cuatro genes de la familia SFRP, los resultados demuestran que el gen SFRP1 se encuentra desmetilado en las líneas celulares Saos-2 y MG-63, mientras que en la línea celular hFOB 1.19 presenta patrones de metilación en su región promotora. En lo que respecta a los genes SFRP2, SFRP4 y SFRP5, se encuentran metilados en las tres líneas celulares antes mencionadas.

Al relacionar los resultados de metilación con los de expresión obtenidos en este estudio, se concluye que la metilación observada en el gen SFRP1 está relacionada con la expresión del mismo en la línea celular hFOB 1.19 ya que se observa una disminución en el estado de metilación y un aumento evidente en su expresión, lo que sugiere que este mecanismo epigenético está involucrado en la regulación de la expresión de este gen. En el caso de SFRP2 se concluye que en las líneas celulares Saos-2 y MG-63 la expresión del gen no se encuentra comprometida por el estado de metilación que presenta. En cuanto a SFRP4 la metilación del gen se encuentra relacionada con la expresión del gen en las líneas celulares hFOB 1.19 y MG-63. Finalmente en cuanto al gen SFRP5 se refiere, no se puede sugerir que la metilación juega un papel importante en la regulación de la expresión de este gen en el tejido óseo ya que en él no tiene incidencia alguna.

8. REFERENCIAS

- Bodine, P. B., Moran, R., Ponce-de-León, H., Bhat, R., Stauffer, B., Green, J., y otros. (2005). The antagonist Secreted Frizzled-Related Protein-1 Controls Osteoblast and Osteocyte Apoptosis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 96, 1212-1230.
- Bovolenta, P., Esteve, P., Ruiz, J., Cisneros, E., & Lopez-Ríos, J. (2008). Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *Journal of Cell Science*, 121(6), 737-746.
- Carstensen, M., Wiza, C., Röhrling, K., Fahlbusch, P., Roden, M., Herder, C., y otros. (2014). Effect of SFRP5 on Cytokine Release and Insulin Action in Primary Human Adipocytes and Skeletal Muscle Cells. *PLOS ONE*, 9, 1-7.
- Clevers, H., & Nusse, R. (2012). Wnt β -catenin Signaling and Disease. *Cell*, 149, 1192-1205.
- Ducy, P., Schinke, T., & Karsenty, G. (2000). The Osteoblast: A Sophisticated Fibroblast under Central Surveillance. *BONE REMODELING AND REPAIR*, 289, 1501-1504.
- Eriksen, E. (2010). Cellular mechanisms of bone remodeling. *Endocrinology Metabolic Disorders*, 11, 219-227.
- Escobar, E. J., & Hawkins, F. (2009). Receptor Wnt: Fisiología, Fisiopatología y Potenciales dianas terapéuticas. *REEMO*, 18(2), 39-44.
- Esteve, P., & Bovolenta, P. (2010). The Advantages and Disadvantages of SFRP1 and SFRP2 expression in Pathological Events. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 221, 11-17.
- Feng, X., & McDonald, J. (2011). Disorders of Bone Remodeling. *Disorders of Bone Remodeling. The Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 6, 121-145.
- García-Ibarba, C., Delgado-Calle, J., Casafont, I., Velasco, J., Arozamena, J., Pérez-Nuñez, M., y otros. (2013). Contribution of genetic and epigenetic mechanisms to Wnt pathway activity in prevalent skeletal disorders. *GENE*, 523, 165-172.
- Gardner, D., & Shoback, D. (2012). *Greenspan: endocrinología básica y clínica* (9 ed.). México: McGrawHill.

- Guo, D., Li, Q., Lv, Q., Wei, Q., Cao, S., & Gu, J. (s.f.). MiR-27a Targets SFRP1 in hFOB Cells to Regulated.
- Haraguchi, R., Kitazawa, R., Mori, K., Tachibana, R., Kiyonari, H., Imai, Y., y otros. (2016). SFRP4- dependent Wnt signal modulation is critical for bone remodeling during postnatal development and age-related bone loss. *Nature*, 1-14.
- Harris, S., Enger, R., Riggs, B., & Spelberg, T. (1995). Characterization of a Conditionally Immortalized Human Fetal Osteoblastic Cell Line. *Journal of Bone and Mineral Research*, 10(2), 178-186.
- Hoepfner, L., Secreto, F., & Westendorf, J. (2009). Wnt Signaling as a Therapeutic Target for Bone Diseases. *Expert Opin Ther Targets*, 13(4), 485-496.
- Klose, R., & Bird, A. (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 31(2), 89-97.
- Kubota, T., Michigami, T., & Ozono, K. (2009). Wnt signaling in bone metabolism. *Bone Miner Metab*, 27, 265-271.
- Meng, H., Cao, Y., Qin, J., Song, X., Zhang, Q., Shi, Y., y otros. (2015). DNA Methylation, Its Mediators and Genome Integrity. *International Journal of Biological Sciences*, 11(5), 604-617.
- Moore, L., Le, T., & Fan, G. (2012). DNA Methylation and Its Basic Function . *Neuropsychopharmacology*, 1-16.
- Mori, H., Prestwich, T., Reid, M., Longo, K., Gerin, I., Cawthorn, W., y otros. (2012). Secreted frizzled-related protein 5 supresses adipocyte mitochondrial metabolism through WNT inhibition. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(7), 2405-2416.
- Mori, K., Kitazawa, R., Kondo, T., Mori, M., Hamad, Y., Nishida, M., y otros. (2014). Diabetic Osteopenia by Decreased β -catenin Signaling is Partly Induced By Epigenetic Derepression of SFRP-4. *PLOS ONE*, 9, 1-11.
- Nakanishi, R., Akiyama, H., Kimura, H., Otsuki, B., Shimizu, M., Tsuboyama, T., y otros. (2008). Osteoblast-Target Expression of SFRP4 in Mice Results In Low Bone Mass. *Journal of Bone and Mineral Research*, 23(2), 271-277.
- Ochoa, A., Juaréz, C., Rosales, M., & Barros, P. (2012). w- β -catenina y su relación con cancer. *Cirugia y Cirujanos*, 80, 389-398.

- Passarge, E. (2010). *Genética: texto y atlas* (3 ed.). Madrid: Médica Panamericana.
- Pautke, C., Schieker, M., Tischer, T., Kolk, A., Neth, P., Mutschler, W., y otros. (2004). Characterization of Osteosarcoma Cell Lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in Comparison to Human Osteoblast. *Anticancer Research*, 24, 3743-3748.
- Piters, E., Boudin, E., & Hul, W. (2008). Wnt signaling: A Wnt for bone. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 473, 112-116.
- Pomduk, K., Kheolamai, P., U-Pratya, Y., Wattanapanitch, M., Klincomhon, N., & Issaragrisil, S. (2015). Enhanced human mesenchymal stem cell survival under oxidative stress by overexpression of secreted frizzled related protein 2 gen. *Ann Hematol*, 94(2), 319-327.
- Riancho, J., & González, J. (2004). *Manual Práctico de Osteoporosis y Enfermedades del Metabolismo Mineral*. Madrid: Jarpyo Editores, S.A.
- Rodenhiser, D., & Mann, M. (2006). Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *Canadian Medical Association*, 174(3), 341-348.
- Roforth, M., Fujita, K., McGregor, U., Kirmani, S., McCready, L., Peterson, J., y otros. (2014). Effects of Age on Bone mRNA Levels of Sclerostin and Other Genes Relevant to Bone Metabolism in Human. *Bone*, 59, 1-6.
- Ross, M. (2007). *Histología: texto y atlas color con Biología Celular y Molecular* (5 ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Salles, T., Dos Santos, C., Campanelli, A., Martins, F., Sogayar, M., & Granjeiro, J. (2008). Tartrate-resistant acid phosphatase activity and glutathione levels are modulated during hFOB 1.19 osteoblastic differentiation. *J Mol Hist*, 39, 627-634.
- Sociedad Española de Reumatología. (2010). *Manual de Enfermedades Óseas*. Madrid: Médica Panamericana.
- Surana, R., Sikka, S., Cai, W., Shin, E., Warriar, S., Tan, H., y otros. (2014). Secreted frizzled related proteins: Implications in cancers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1845, 53-65.
- Tollefsbol, T. (2011). *Epigenetics Protocols*. New York : Humana Press.

- Trevant, B., Gaur, T., Hussain, S., Symons, J., Komm, B., & Lian, J. (2008). Expression of Secreted Frizzled Related Protein 1, A Wnt Antagonist in Brain, Kidney and Skeleton is Dispensable for Normal Embryonic Development. *J Cell Physiol*, 217(1), 113-126.
- Velasco, J., & Riancho, J. (2008). La Vía Wnt y el Hueso. *REEMO*, 17(1), 5-9.
- Vrtacnik, P., Marc, J., & Ostanek, B. (2014). Epigenetic mechanisms in bone. *Clin Chem Lab Med*, 52(5), 589-608.
- Wang, Y., Li, Y., Paulson, C., Shao, J., Zhang, X., Wu, M., y otros. (2014). Wnt and the Wnt signaling pathway in bone development and disease. *Frontiers in Bioscience*, 19, 379-407.
- Welsch, U., & Sobotta, J. (2008). *Histología*. Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Westendorf, J., Khaler, R., & Schroeder, T. (2004). Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *GENE an International Journal on Genes and Genomes*, 341, 19-39.
- Xiao, Q., Yang, Y., Zhang, X., & An, Q. (2016). Enhanced Wnt signalling by methylation-mediated loss of SFRP2 promotes osteosarcoma cell invasion. *Tumor Biology*, 37, 6315-6321.
- Yao, W., Cheng, Z., Shahnazar, M., Dai, W., Johnson, M., & Lane, N. (2010). Overexpression of Secreted Frizzled-Related Protein 1 Inhibits Bone Formation and Attenuates Parathyroid Hormone Bone Anabolic Effects. *JBMR*, 25(2), 190-199.