

Adipogénesis y osteoporosis

Juan Pablo Rodríguez^{1a}, Pablo Astudillo^{1b}, Susana Ríos^{1c}, Germán Seitz², Ana María Pino^{1d}.

Adipogenesis and osteoporosis

Mesenchymal stem cells (MSCs) found in bone marrow stroma, are able to differentiate into osteoblasts and adipocytes, among other cell phenotypes. In normal bone marrow balanced osteoblastic and adipocytic cell differentiation favours bone formation, while in osteoporosis there is an increased adipocyte content. Since osteoblasts and adipocytes originate from a common MSC precursor cell, here we discuss whether quantitative and qualitative stem cell defects may be the cause of alterations in the number and function of differentiated cells. This review analyzes some conditions that contribute to different osteogenic/adipogenic potentials in human bone marrow MSCs obtained from control and osteoporotic postmenopausal women. We analyze the protective effect exerted by locally generated factors like estradiol and leptin on MSCs differentiation, because altered bioavailability of these factors may play a role in osteoporosis. Osteoporotic MSCs (o-MSCs) are characterized by increased adipogenic potential as compared to control cells. Leptin exerted a direct protective action against adipogenesis only in control cells. In contrast, leptin action on o-MSCs is hampered, suggesting that inadequate leptin action may be associated to lipid accumulation in bone marrow (Rev Méd Chile 2009; 137: 827-36).

(Key words: Adipogenesis; Mesenchymal stem cells; Osteoporosis)

Recibido el 21 de enero, 2008. Aceptado el 15 de septiembre, 2008.

Trabajo financiado por Proyecto Fondecyt N° 1050930.

¹Laboratorio de Biología Celular, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), Universidad de Chile, ²Hospital Sótero del Río, Santiago, Chile.

^aBioquímico, Doctor en Ciencias

^bIngeniero en Biotecnología Molecular, Alumno de Magíster en Ciencias, Fac. Ciencias, Universidad de Chile

^cAnalista Químico

^dBioquímico

En condiciones normales, el hueso, al igual que los otros tejidos, está en constante recambio y la formación y resorción ósea están en equilibrio. A nivel celular, los procesos de formación y degradación de hueso dependen de la actividad de osteoblastos y osteoclastos, respectivamente.

La formación del hueso involucra la proliferación de las células progenitoras, la migración de las progenitoras osteogénicas a la superficie del hueso y su diferenciación a osteoblastos. Estas últimas células secretan abundantes proteínas de matriz extracelular, sobre la cual se deposita calcio¹. Como consecuencia del envejecimiento, hay una pérdida neta de hueso porque durante este período la resorción excede a la formación ósea².

En la osteoporosis, el desequilibrio entre la resorción y formación del hueso está aumentado y

Correspondencia a: J. Pablo Rodríguez. Laboratorio de Biología Celular, INTA, Universidad de Chile. Macul 5540, Casilla 138-11, Santiago, Chile. E mail: jprodrig@inta.cl

ocurre mayor pérdida de masa ósea que la esperada como consecuencia del envejecimiento. La pérdida de la función gonadal contribuye a dicho desequilibrio y se asocia generalmente con aumento en el proceso de resorción ósea³.

Las células responsables de la formación ósea, los osteoblastos, derivan de las células progenitoras mesenquimáticas (MSCs), presentes en el estroma de la médula ósea. Estas células (también conocidas como "células madre") constituyen una población de células progenitoras adultas, son multipotentes porque tienen la capacidad para diferenciarse a diferentes fenotipos celulares, entre ellos a osteoblastos, condrocitos, adipocitos, miocitos, células de estroma de la médula ósea, etc⁴⁻⁷. El compromiso de diferenciación de las MSCs hacia un fenotipo definido ocurre durante etapas muy tempranas de la diferenciación; la interacción genético-ambiental define el destino de la célula hacia uno de los linajes posibles. Aunque hay dudas respecto de los fenómenos celulares y moleculares que participan en el compromiso de las MSCs, se admite que su regulación es compleja y variable en el tiempo^{8,9}. Actualmente se reconoce la importancia del microambiente en el que se encuentran las MSCs en la médula ósea; ya que entrega señales desde otros fenotipos celulares, de la matriz extracelular y de factores locales o sistémicos, influyendo en el compromiso celular y en la posterior diferenciación^{8,9}. Hasta ahora, la mayoría de las interacciones celulares y moleculares de las MSCs en su microambiente son desconocidas.

Considerando que una misma célula progenitora tiene el potencial para originar osteoblastos y adipocitos, se plantea la posibilidad de que la diferenciación requiera compensación entre los linajes. ¿Qué condiciones definen el equilibrio apropiado entre las diferentes vías de diferenciación? Si las condiciones del microambiente favorecen el potencial adipogénico de las células, ¿ocurre en desmedro del potencial osteogénico? ¿Puede este tipo de desequilibrio contribuir a la manifestación de determinadas alteraciones óseas, como la osteoporosis, por ejemplo? Se ha postulado que en dicha enfermedad hay un desequilibrio entre el potencial osteogénico/adipogénico de las MSCs, lo que indicaría que hay una modificación del compromiso de diferenciación de estas células.

Un estudio pionero que analizó mediante histomorfometría biopsias de cresta ilíaca de mujeres

mayores, demostró que la médula ósea de mujeres con osteoporosis tiene una acumulación de adipocitos mayor que los niveles observados en mujeres sanas jóvenes¹⁰. Estudios posteriores han confirmado mayor adiposidad en la médula ósea de mujeres con osteoporosis, así como una asociación negativa entre grasa en la médula ósea y la velocidad de formación de hueso¹¹⁻¹³. A pesar de estos antecedentes, hasta hace poco la infiltración grasa de la médula ósea se había considerado como una secuela irrelevante del envejecimiento normal. Recientemente, se ha propuesto que en pacientes osteoporóticas la acumulación de tejido adiposo en la médula ósea se contrarresta con una disminución en la producción de células osteogénicas^{14,15}. Este tipo de diferenciación celular descompensada caracteriza también a otras condiciones asociadas con la pérdida de hueso, tales como ooforectomía, envejecimiento, inmovilización, diabetes, tratamiento con glucocorticoides o microgravedad¹⁶.

En esta revisión se analiza la evidencia experimental que señala que en la osteoporosis las MSCs tienen un mayor potencial de diferenciación adipogénico que las células normales. También, se analiza la participación de algunos factores específicos del microambiente óseo que contribuyen a mantener el equilibrio entre los linajes adipogénicos y osteogénicos.

DIFERENCIACIÓN DE MSCs HACIA OSTEOLASTOS Y ADIPOCITOS

El compromiso y diferenciación a osteoblastos requiere la expresión y acción secuencial en la célula de varios factores reguladores¹⁷. Estudios en modelos animales han demostrado, entre otros, que durante la osteogénesis se requiere el factor de transcripción Runx2/Cbfa1¹⁸⁻²⁰, osterix²¹; y la vía de señalización Wnt^{22,23}. Por otra parte, la adipogénesis requiere la activación y acción conjunta de dos factores: el receptor gama activado por proliferadores de peroxisoma (PPAR γ *peroxisome proliferator-activated receptor- γ*), y la proteína ligante a CCAAT (C/EBP α) (CCAAT/*enhancer-binding protein- α*). El PPAR γ se expresa tempranamente en la adipogénesis²⁴⁻²⁶; la actividad de este factor de transcripción es regulada positivamente por ligandos lipofílicos específicos²⁶, y negativamente por fosforilación en la serina 112 de la proteína²⁷.

Estudios en animales sustentan el modelo de diferenciación descompensada: la activación de PPAR γ regula positivamente la diferenciación adipogénica, pero es a la vez un regulador negativo de la diferenciación osteogénica^{11,28-32}. Otra señal importante en la diferenciación de las MSCs es la vía Wnt; estudios en modelos animales muestran que esta vía de señalización aumenta la masa ósea¹³. La activación de Wnt controla el compromiso de las células hacia osteoblastos y bloquea la adipogénesis inhibiendo la expresión de los factores de transcripción C/EBP α y PPAR γ ^{13,33,34}. Por otra parte, la expresión temprana de Runx2 en las MSCs inhibiría la diferenciación hacia adipocitos, ya que las células que no expresan Runx2, se diferencian espontáneamente a adipocitos³⁵.

DIFERENCIACIÓN ADIPOGÉNICA DE MSCs Y OSTEOPOROSIS

Actualmente, pocos estudios relacionan el progreso de la osteoporosis con alteraciones funcionales de las células progenitoras, ya sea de osteoclastos (unidades formadoras de colonias granulocito/macrofago GM-CFU), o de osteoblastos (MSCs). La mayor parte de los estudios *in vitro* han usando células óseas maduras o en diferenciación principalmente de origen animal³⁶⁻⁴⁰. Por lo tanto, es de interés conocer si hay diferencia funcional entre MSCs obtenidas de la médula ósea de mujeres controles y osteoporóticas. En la Tabla 1 están las características de donantes controles y osteoporóticas de médula ósea. Entre otras diferencias, se ha

determinado que las MSCs provenientes de donantes osteoporóticas (o-MSCs) en condiciones osteogénicas presentan actividad fosfatasa alcalina disminuida y depositan menos calcio que las MSCs controles (c-MSCs)³⁹, lo que está en concordancia con su capacidad reducida para producir células óseas maduras. Además, las o-MSCs muestran una menor producción de TGF- β y menor capacidad para generar y mantener una matriz extracelular rica en colágeno tipo I, comparadas con las c-MSCs, condiciones que promueven la diferenciación adipogénica⁴⁰. El potencial adipogénico aumentado de las o-MSCs fue corroborado por la generación de un mayor número de adipocitos, comparada con las c-MSCs, luego de tratamiento adipogénico⁴¹. Estas observaciones apoyan la idea de que en la médula ósea de mujeres postmenopáusicas osteoporóticas, el aumento de la grasa ocurre a expensas de la osteogénesis³⁷, así como que defectos cuali y cuantitativos de las células progenitoras pueden resultar en la alteración en el número y función celular relacionados con la edad⁴².

FACTORES DEL MICROAMBIENTE QUE AFECTAN LA ADIPOGÉNESIS: ESTRÓGENOS Y LEPTINA

El microambiente de la médula ósea es complejo y juega un rol importante en el compromiso y diferenciación de las MSCs. Entre los muchos componentes del microambiente, en esta revisión se analizan la contribución de estrógenos y leptina, generados localmente.

Tabla 1. Características de las donantes de células progenitoras mesenquimáticas (MSCs)

Característica	Control	Osteoporótica	Valor P
Edad (años)	71,4±3,83	72,3±8,41	0,818
t-score*	-1,22±0,95	-3,83±1,37	0,002
DMO (g/cm ²)**	1,057±0,116	0,742±0,164	0,002

*t-score, número de desviaciones estándar en que difiere el contenido mineral en columna lumbar de un individuo, respecto al valor en una población adulta joven. **DMO, densidad mineral ósea.

Las donantes firmaron un consentimiento informado aprobado por los Comité de Etica del INTA y del Hospital Sótero del Río.

a) **Estrógenos.** La disminución del estradiol endógeno luego de la menopausia se ha asociado con un aumento del recambio óseo acompañado por un desplazamiento de la razón adipocito/osteoblasto, que favorece la producción de tejido graso en la médula ósea^{43,44}. El efecto directivo de los estrógenos sobre la mantención del tejido óseo fue valorado especialmente por la observación de fallas óseas en hombres que presentan actividad estrogénica deficiente, ya sea por una disfunción del receptor de estrógenos o de la aromatasa^{45,46}; así como por la correlación entre la concentración de estradiol endógeno y la densidad mineral^{47,48}.

La biosíntesis de estrógenos a partir de esteroides C19 es catalizada por la enzima aromatasa citocromo P450. Esta enzima se encuentra en las gónadas y en diferentes tejidos y órganos, tales como tejido adiposo, cerebro, piel, endotelio y hueso. Las células de hueso expresan además otras enzimas del metabolismo de esteroides sexuales⁴⁹⁻⁵², lo que sugiere que en la médula ósea hay síntesis activa de andrógenos y estrógenos, a partir de precursores C19 circulantes. La aromatasa se expresa en varios fenotipos del tejido óseo^{50,53-56}. Se ha propuesto que la producción y acción local de estrógenos tendría importancia en la regulación del compromiso de las MSCs hacia la vía osteogénica o adipogénica^{50,53}. Estudios en animales *knockout* para el receptor de estrógenos⁵⁷ o deficientes en aromatasa han concluido que la adipogénesis extramedular estaría regulada negativamente por estrógenos⁵⁸; en estos trabajos los adipocitos de la médula ósea no fueron estudiados. Por otra parte, en células aisladas se ha observado regulación recíproca de la diferenciación osteogénica y adipogénica por estrógenos^{53,59}.

Observaciones recientes realizadas en nuestro laboratorio sustentan la proposición de que la síntesis local de estrógenos puede ser trascendente durante la diferenciación de las MSCs, puesto que hay un aumento significativo de la actividad aromatasa en las células luego de tratamiento con medio de diferenciación osteogénico o adipogénico. Además, demostramos aumento de la diferenciación osteogénica y represión de la diferenciación adipogénica, cuando el medio contenía los sustratos estrogénicos androstenediona o testosterona⁶⁰. Ya que el efecto positivo de estos compuestos fue anulado por la presencia de

inhibidores específicos de aromatasa, o del receptor de estrógenos, concluimos que la respuesta celular resulta del estradiol generado endógenamente (Figura 1). Estos resultados señalan la importancia de la actividad de aromatasa durante el compromiso y diferenciación de las MSCs

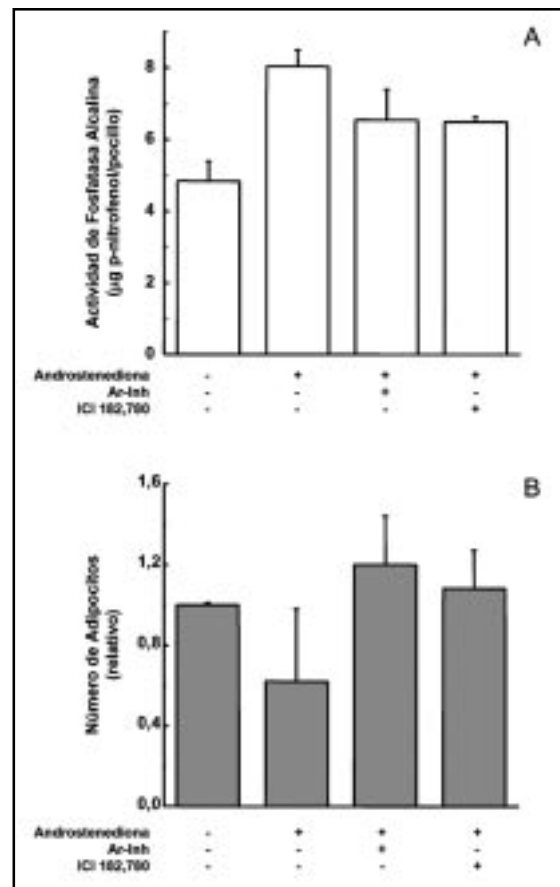


Figura 1. Diferenciación osteogénica (A) y adipogénica (B) de MSC en condiciones estrogénicas. Las MSCs fueron cultivadas en medio osteogénico (0,1 µM dexametasona, 10 mM βglicerofosfato y 50 µg/ml ácido ascórbico) o adipogénico (1 µM dexametasona, 10 µg/ml insulina, 0,45 mM isobutilmetil-xantina y 0,1 mM indometacina), en presencia de 100 nM de androstenediona, 0,5 mM de inhibidor de aromatasa (Ar-Inh: 4-androsten-4-ol-3,17-diona) o 100 nM de inhibidor del receptor de estrógenos (ICI-182,780). La osteogénesis se evaluó por la actividad de fosfatasa alcalina y la adipogénesis por el número de adipocitos determinado por citometría de flujo.

humanas. Un aumento temprano de estrógenos durante la diferenciación afectaría el compromiso de las MSCs, ya sea restringiendo la diferenciación adipogénica, facilitando la diferenciación osteogénica o ambas. Durante el envejecimiento y en algunas alteraciones óseas, la disponibilidad de sustratos o la regulación de la aromatasas podrían afectar la diferenciación de las MSCs⁶⁰ (Figura 3). Estas observaciones apoyan la hipótesis que propone que para una remodelación ósea normal se podría requerir un nivel umbral de estradiol^{61,62}, el cual resultaría tanto de una actividad aromatasas endógena adecuada como de la presencia de precursores C19.

b) Leptina. Numerosos estudios clínicos han demostrado relación directa entre la masa grasa y la masa ósea, sin embargo no resulta clara la relación entre obesidad y sistema esquelético. Recientemente se ha propuesto que la leptina, entre otras adipocinas, tendría un efecto beneficioso sobre el tejido óseo^{63,64}, aunque los efectos de la leptina sobre dicho tejido son contradictorios⁶⁵. Los niveles séricos de leptina están aumentados en la obesidad^{66,67}. En ratones, la leptina administrada intraperitonealmente estimula la diferenciación de osteoblastos y el crecimiento óseo, pero tiene un efecto inhibitorio en la formación ósea si se administra a nivel de sistema

nervioso central⁶⁸. Aunque se reconoce que los efectos de leptina son mediados parcialmente vía hipotálamo⁶⁹, esta hormona operaría también directamente sobre tejidos periféricos^{70,71}, porque el receptor de leptina se encuentra distribuido ampliamente, incluyendo a las MSCs^{41,72}.

Estudios *in vitro* indican que en respuesta a leptina, las células de estroma de la médula ósea aumentan la proliferación y la diferenciación hacia el linaje osteoblástico^{71,72}, pero la diferenciación hacia adipocitos se inhibe^{41,72}. Además, leptina estimula la fosforilación de PPAR γ ⁷³ y la actividad aromatasas en las MSCs durante las etapas tempranas de la diferenciación⁶⁰. Recientemente, se ha demostrado que la capacidad de unión de leptina a las MSCs varía durante la diferenciación adipogénica y osteogénica. Además, la leptina inhibe significativamente la diferenciación adipogénica en c-MSCs, pero no en o-MSCs⁴¹. Otros autores han observado también este tipo de respuesta en células inmortalizadas de estroma de médula ósea⁷². A nivel celular el efecto protector de leptina se expresaría como una inhibición de la diferenciación a adipocitos, favoreciendo la diferenciación hacia el linaje osteogénico^{65,72}.

El mayor potencial adipogénico que se observa en las o-MSCs comparadas con las c-MSCs, se explica a nivel molecular por un mayor nivel de PPAR γ en las o-MSCs, tanto antes como durante la

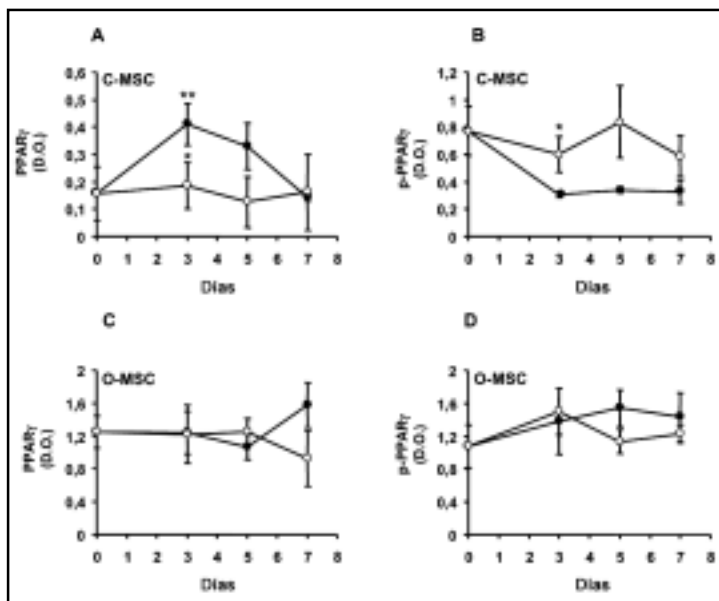


Figura 2. Determinación del nivel de PPAR γ y PPAR γ fosforilado (p-PPAR γ) durante la diferenciación adipogénica de las MSCs. Células control (A,B: c-MSCs) y osteoporóticas (C,D: o-MSCs) fueron cultivadas en condiciones adipogénicas en ausencia (círculos llenos) o presencia (círculos abiertos) de 62,5 nM leptina. El contenido PPAR γ y p-PPAR γ se determinó por Western blot y densitometría, y se normalizaron por β -actina. Los resultados se expresan como densidad óptica. *p < 0,05 comparado con el valor en c-MSCs. **p < 0,05 comparado con el valor al día 0 de diferenciación.

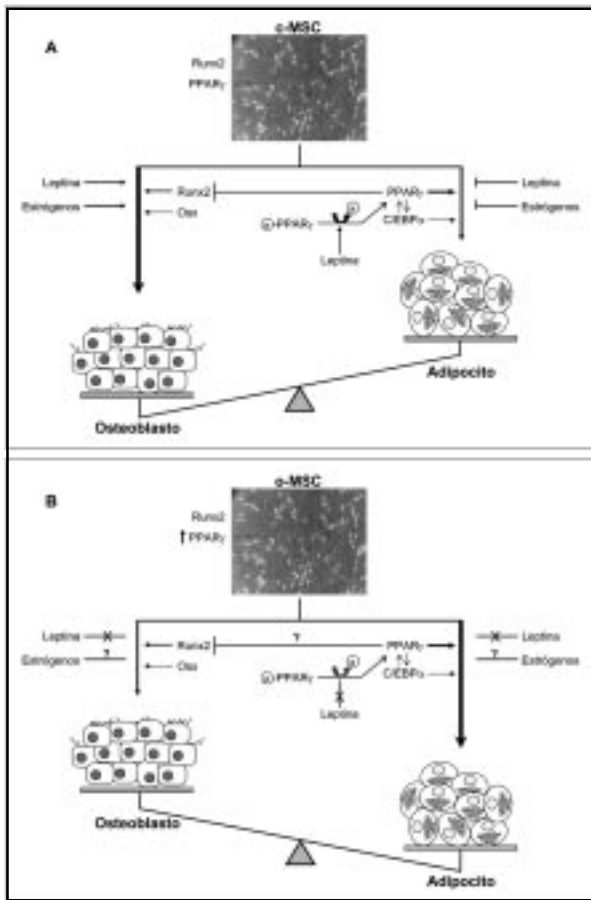


Figura 3. Esquema de la diferenciación osteogénica y adipogénica en las MSCs. (A) Osteogénesis favorecida en células controles. (B) Adipogénesis favorecida en células osteoporóticas. Las flechas (→) indican estímulo, las líneas interrumpida (T) indican inhibición, (X) indica no efecto y (?) significa efecto desconocido.

diferenciación adipogénica (Figura 2A, C). Se puede observar que la presencia de leptina durante dicha diferenciación, disminuye significativamente el contenido de PPARγ sólo en las c-MSCs (Figura 2A, C)⁷⁴. Puesto que la expresión de mRNA para PPARγ fue similar en ambos tipos de células, se podría conjeturar la participación de algún tipo de regulación postraduccional para dar cuenta del alto contenido de PPARγ de las o-MSCs. Una posibilidad resulta de la fosforilación de PPARγ modificación que inactiva al factor de transcripción; así, el nivel de PPARγ fosforilado (p-

PPARγ) representa una medida del PPARγ inactivo^{27,75}. Según esto, se observa que antes de diferenciación, el nivel de p-PPARγ es similar en c-MSCs y o-MSCs (Figura 2B y D). Durante la diferenciación adipogénica el contenido de la forma inactiva de PPARγ disminuye sólo en las c-MSCs, mientras que las o-MSCs mantienen el nivel basal a través de todo el período estudiado. Parece interesante, que la leptina agregada durante la adipogénesis aumentó significativamente el nivel de p-PPARγ sólo en las c-MSCs, lo cual es consistente con el efecto inhibitorio de leptina sobre la adipogénesis. En contraste, la presencia de la adipoquina durante la diferenciación adipogénica no cambió el nivel de p-PPARγ en las o-MSCs (Figura 2B y D)⁷⁴. Se puede suponer que incluso cambios muy pequeños en la disponibilidad de PPARγ activo/inactivo afectaría el potencial adipogénico de las células, debido a que ambos, mRNA para PPARγ y la proteína tienen vida media corta⁷⁶.

Por otro lado, la leptina es producida localmente por las MSCs y hay diferencia en la expresión del mRNA para leptina entre c-MSCs y o-MSCs. En condiciones de no diferenciación, las c-MSCs no transcriben el gen de leptina, pero éste sí se expresa durante las etapas tempranas de diferenciación. Además, leptina agregada exógenamente durante la adipogénesis de c-MSCs estimula la transcripción de este gen. En contraste, durante las etapas tempranas de la diferenciación adipogénica de o-MSCs, no se detecta el transcripto para leptina, a pesar de la mayor capacidad adipogénica de estas células. Sin embargo, la adición de leptina exógena durante la adipogénesis de las o-MSCs, determina la expresión del mRNA para la adipoquina en forma tardía⁷⁴, sugiriendo que estas células requieren altas dosis de leptina para desarrollar alguna respuesta. Se podría especular que la baja transcripción del gen para leptina en estas células resultaría de la actividad alta de PPARγ, ya que se ha demostrado en otro tipo de células, que una alta actividad de PPARγ inhibe la transcripción del gen de leptina^{77,78}.

Se puede proponer entonces que el efecto protector de leptina en las c-MSCs disminuiría el nivel de PPARγ (activo) y aumentaría el nivel de p-

PPAR γ inactivo restringiendo el potencial adipogénico celular. En contraste, en las o-MSCs el efecto de leptina estaría bloqueado muy tempranamente durante la adipogénesis, permitiendo así manifestar el potencial adipogénico de estas células (Figura 3). Estos resultados sugieren que además de la diferencia en el nivel de PPAR γ entre células controles y osteoporóticas, éstas últimas tienen una menor capacidad para responder al estímulo de leptina. Durante la adipogénesis temprana, las o-MSCs se caracterizan por una señalización subóptima para leptina, resultante en parte del nivel disminuido de su receptor⁴¹, así como también de menor producción de leptina.

Una acción insuficiente de leptina aparece enmascarada en estados clínicos como el síndrome metabólico, la obesidad (inducida por dieta, por pérdida de leptina o de su receptor), la lipodistrofia, el envejecimiento, etc.⁷⁹. Parece interesante proponer que una falla en la señalización celular de la leptina contribuye a la adipogénesis anómala de las o-MSCs. Durante el desarrollo de la osteoporosis, diferentes agentes podrían contribuir al origen de fallas en la acción celular de leptina, entre otros la inducción de SOC-3 por citoquinas, el aumento de glucocorticoides endógenos o exógenos, la disminución de estrógenos, etc.⁷⁹.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Diversas características funcionales de las MSCs de mujeres osteoporóticas, están alteradas comparadas con las de células control. Estos defectos cuali y cuantitativos en las o-MSCs se relacionan con la alteración de fenómenos germinales en el programa de diferenciación celular.

Nuestras observaciones apoyan a nivel celular y molecular la idea de que en la médula ósea de mujeres postmenopáusicas osteoporóticas, el aumento de la grasa ocurre a expensas de la

osteogénesis. Las o-MSCs tienen un mayor potencial adipogénico que las c-MSCs, caracterizado por un mayor contenido de PPAR γ e incapacidad para inactivar dicho factor por fosforilación. Además, participan factores de regulación que se generan en el microambiente de las MSCs; entre ellos estradiol y leptina, los cuales protegen la osteogénesis o restringen la adipogénesis.

La leptina tiene una acción protectora directa, que es contraria a la adipogénesis, sólo en las células controles. En contraste, la actividad de leptina sobre o-MSCs estaría bloqueada, cooperando para una adipogénesis aumentada. Se puede proponer que una falla en la señalización celular de la leptina puede contribuir a la adipogénesis anómala de las o-MSCs. Los antecedentes aquí resumidos, señalan la importancia que tienen las etapas tempranas de diferenciación de las MSCs en la formación de hueso. Las MSCs de la médula ósea, entonces, podrían ser blanco para nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a facilitar la vía osteogénica o debilitar el compromiso y diferenciación hacia adipocitos. De acuerdo a las evidencias discutidas, deben considerarse las condiciones celulares apropiadas para la producción local de estradiol y leptina, así como la restricción de la producción endógena de ligandos de PPAR γ .

Se ha creado mucha expectativa con respecto a terapias basadas en el trasplante de células progenitoras; nuestros resultados advierten sobre la necesidad de caracterizar las propiedades funcionales de estas células previo a su trasplante, ya que la funcionalidad de dichas células puede, en algunos casos, estar alterada.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los Drs. O. Brunser, F. Cortés, M. Fernández y J. Martínez por la revisión crítica del manuscrito y sus valiosos comentarios. Este trabajo fue apoyado por el proyecto FONDECYT # 1050930.

REFERENCIAS

1. LECANDA F, AVIOLI LV, CHENG S-L. Regulation of bone matrix protein expression and induction of differentiation of human osteoblasts and human bone marrow stromal cells by bone morphogenetic protein-2. *J Cell Biochem* 1997; 67: 386-98.
2. American College of Obstetricians and Gynecologists. Osteoporosis. *Obstet Gynecol* 2004; 104: 66S-76S.
3. MANOLAGAS SC, JILKA RL. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. *N Engl J Med* 1995; 332: 305-11.
4. BRUDER SP, JAISWAL N, HAYNESWORTH SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during

- extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 1997; 64: 278-94.
5. PITTENGER MF, MACKAY AM, BECK SC, JAISWAL RK, DOUGLAS R, MOSCA JD ET AL. Multineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-7.
 6. JIAN Y, VAESSEN B, LENVIK T, BLACKSTAD M, REYES M, VERFAILLIE CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 2002; 30: 896-904.
 7. KEENE CD, ORTIZ-GONZÁLEZ XR, JIANG Y, LARGAESPADA DA, VERFAILLIE CM, LOW WC. Neural differentiation and incorporation of bone marrow-derived multipotent adult progenitor cells alter single cell transplantation into blastocyst stage mouse embryos. *Cell transplant* 2003; 12: 201-13.
 8. ZIPORI D. The stem state: Mesenchymal plasticity as a paradigm. *Curr Stem Cell Res Ther* 2006; 1: 95-102.
 9. MINGUELL JJ, ERICES A, CONGET P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* 2001; 226: 507-20.
 10. MEUNIER P, AARON J, EDOUARD C, VIGNON G. Osteoporosis and the replacement of cell populations of the marrow by adipose tissue. A quantitative study of 84 iliac bone biopsies. *Clin Orthop Relat Res* 1971; 80: 147-54.
 11. OGAWA S, URANO T, HOSOI T, MIYAO M, HOSHINO S, FUJITA M ET AL. Association of bone mineral density with a polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene: PPARgamma expression in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 260: 122-6.
 12. BODINE PV, ZHAO W, KHARODE YP, BEX FJ, LAMBERT AJ, GOAD MB ET AL. The Wnt antagonist secreted frizzled related protein-1 is a negative regulator of trabecular bone formation in adult mice. *Mol Endocrinol* 2004; 18: 1222-37.
 13. BENNETT CN, LONGO KA, WRIGHT WS, SUVA LJ, LANE TF, HANKENSON KD ET AL. Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 3324-9.
 14. BENNETT JH, JOYNER, CJ, TRIFFITT JT, OWEN ME. Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential. *J Cell Sci* 1991; 99: 131-9.
 15. JI X, CHEN D, XU C, HARRIS SE, MUNDY GR, YONEDA T. Patterns of gene expression associated with BMP-2-induced osteoblast and adipocyte differentiation of mesenchymal progenitor cell 3T3-F442A. *J Bone Miner Metab* 2000; 18: 132-9.
 16. ZAYZAFON M, GATHINGS WE, MCDONALD JM. Modeled microgravity inhibits osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells and increases adipogenesis *Endocrinology* 2004; 145: 2421-32.
 17. KOMORI T. Regulation of Osteoblast Differentiation by Transcription Factors. *J Cell Biochem* 2006; 99: 1233-9.
 18. NISHIMURA R, HATA K, HARRIS SE, IKEDA F, YONEDA T. Core-binding factor alpha 1 (Cbfa1) induces osteoblastic differentiation of C2C12 cells without interactions with Smad1 and Smad5. *Bone* 2002; 31: 303-12.
 19. ZHENG H, GUO Z, MA Q, JIA H, DANG G. Cbfa1/osf2 transduced bone marrow stromal cells facilitate bone formation *in vitro* and *in vivo*. *Calcif Tissue Int* 2004; 74: 194-203.
 20. ZHAO Z, ZHAO M, XIAO G, FRANCESCHI RT. Gene transfer of the Runx2 transcription factor enhances osteogenic activity of bone marrow stromal cells *in vitro* and *in vivo*. *Mol Ther* 2005; 12: 247-53.
 21. NAKASHIMA K, ZHOU X, KUNKEL G, ZHANG Z, DENG JM, BEHRINGER RR ET AL. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 2002; 108: 17-29.
 22. DAY TF, GUO X, GARRETT-BEAL L, YANG Y. Wnt/ β catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell* 2005; 8: 739-50.
 23. HILL TP, SPATER D, TAKETO MM, BIRCHMEIER W, HARTMANN C. Canonical Wnt/ β -catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell* 2005; 8: 727-38.
 24. MANGELSDORF DJ, EVANS RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 1995; 83: 841-50.
 25. KERSTEN S, DESVERGNE B, WAHLI W. Roles of PPARs in health and disease. *Nature* 2000; 405: 421-4.
 26. ROSEN ED, SPIEGELMAN BM. PPAR γ : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J Biol Chem* 2001; 276: 37731-4.
 27. HU E, KIM JB, SARRAF P, SPIEGELMAN BM. Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma. *Science* 1996; 274: 2100-3.
 28. LECKA-CZERNIK B, GUBRIJ I, MOERMAN EA, KAJKENOVA O, LIPSCHITZ DA, MANOLAGAS SC ET AL. Inhibition of Osf2/Cbfa1 expression and terminal osteoblast differentiation by PPAR-gamma2. *J Cell Biochem* 1999; 74: 357-71.
 29. JEON MJ, KIM JA, KWON SH, KIM SW, PARK KS, PARK SW ET AL. Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ inhibits the Runx2-mediated transcription of osteocalcin in osteoblasts. *J Biol Chem* 2003; 278: 23270-7.
 30. KHAN E, ABU-AMER Y. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ inhibits differentiation of preosteoblasts. *J Lab Clin Med* 2003; 142: 29-34.
 31. LAZARENKO OP, RZONCA SO, HOGUE WR, SWAIN FL, SUVA LJ, LECKA-CZERNIK B. Rosiglitazone induces decreases in bone mass and strength that are reminiscent of aged bone. *Endocrinology* 2007; 148: 2669-80.
 32. COCK TA, BACK J, ELEFTERIOU F, KARSenty G, KASTNER P, CHAN S, AUWERX J. Enhanced bone formation in lipodystrophic PPAR γ ^{hyp/hyp} mice relocates haematopoiesis to the spleen. *EMBO Reports* 2004; 5: 1007-12.

33. QIU W, ANDRESEN TE, BOLLERSLEV J, MANDRUP S, ABDALLAH BM, KASSEM M. Patients with high bone mass phenotype exhibit enhanced osteoblast differentiation and inhibition of adipogenesis of human mesenchymal stem cells. *J Bone Min Res* 2007; 22: 1720-31.
34. RAWADI G, VAYSSIERE B, DUNN F, BARON R, ROMAN-ROMAN S. BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *J Bone Miner Res* 2003; 18: 1842-53.
35. KOBAYASHI H, GAO Y, UETA C, YAMAGUCHI A, KOMORI T. Multilineage differentiation of Cbfa1-deficient calvarial cells *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 273: 630-6.
36. GIMBLE JM, ROBINSON CE, WU X, KELLY KA. The function of adipocytes in the bone marrow stroma: An update. *Bone* 1996; 19: 421-8.
37. NUTTALL ME, PATTON AJ, OLIVERA DL, NADEAU DP, GOWEN M. Human trabecular bone cells are able to express both osteoblastic and adipocytic phenotype: Implications for osteopenic disorders. *J Bone Miner Res* 1998; 13: 371-82.
38. BIANCO P, ROBESY PG. Diseases of bone and stromal cell lineage. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 336-41.
39. RODRÍGUEZ JP, GARAT S, GAJARDO H, PINO AM, SEITZ G. Abnormal osteogenesis in osteoporotic patients is reflected by altered mesenchymal stem cells dynamics. *J Cell Biochem* 1999; 75: 414-23.
40. RODRÍGUEZ JP, MONTECINOS L, RÍOS S, REYES P, MARTÍNEZ J. Mesenchymal Stem Cells from osteoporotic patients produce a type I collagen-deficient extracellular matrix favoring adipogenic differentiation. *J Cell Biochem* 2000; 79: 557-65.
41. HESS R, PINO AM, RÍOS S, FERNÁNDEZ M, RODRÍGUEZ JP. High affinity leptin receptors are present in human mesenchymal stem cells (MSCs) derived from control and osteoporotic donors. *J Cell Biochem* 2005; 94: 50-7.
42. BERGMAN RJ, GAZIT D, KAHN AJ, GRUBER H, MCDUGALL S, HAHN TJ. Age-related changes in osteogenic stem cells in mice. *J Bone Miner Res* 1996; 11: 568-77.
43. GAMBACCIANI M, CIAPONI M, CAPPAGLI B, PIAGGESI L, DE SIMONE L, ORLANDI R ET AL. Body weight, body fat distribution, and hormonal replacement therapy in early post menopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 414-7.
44. JUSTESEN J, STENDERUP K, EBBESEN EN, MOSEKILDE L, STEINICHE T, KASSEM M. Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. *Biogerontology* 2001; 2: 165-71.
45. SMITH EC, BOYD J, FRANCK GR, TAKAHASHI H, COHEN RM, SPECKER B ET AL. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N Engl J Med* 1994; 331: 1056-61.
46. MORISHIMA A, GRUMBACH MM, SIMPSON ER, FISHER C, QIN K. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 86: 3689-98.
47. AMIN S, ZHANG Y, SAWIN CT, EVANS SR, HANNAN MT, KIEL DP ET AL. Association of hypogonadism and estradiol levels with bone mineral density in elderly men from the Framingham study. *Ann Intern Med* 2000; 133: 951-63.
48. KHOSLA S, MELTON III LJ, ATKINSON EJ, O'FALLON WM. Relationship of sex steroids to longitudinal changes in bone mineral density and bone resorption in young versus elderly men: effects of estrogen on peak bone mass and on age-related bone loss. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 3555-61.
49. COMPSTON J. Editorial: Local biosynthesis of sex steroids in bone. *Journal of Clinical Endocrinol Metab* 2002; 87: 5398-400.
50. JANSSEN JMMF, BLAND R, HEWISON M, COUGHTRIE MW, SHARP S, ARTS J ET AL. Estradiol formation by human osteoblasts via multiple pathways: relation with osteoblast function. *J Cell Biochem* 1999; 75: 528-37.
51. ISHIDA Y, KILLINGER DW, KHALIL MW, YANG K, STRUTT B, HEERSCHE JN. Expression of steroid-converting enzymes in osteoblasts derived from rat vertebrae. *Osteoporosis International* 2002; 13: 235-40.
52. ISSA S, SCHNABEL D, FEIX M, WOLF L, SCHAEFFER HE, RUSSELL DW ET AL. Human osteoblast-like cells express predominantly steroid 5 α -reductase type 1. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 5401-7.
53. HEIM M, FRANK O, KAMPMANN G, SOCHOCKY N, PENNIMPEDE T, FUCHS P ET AL. The phytoestrogen genistein enhances osteogenesis and represses adipogenic differentiation of human primary bone marrow stromal cells. *Endocrinology* 2004; 145: 848-59.
54. PUROHIT A, FLANAGAN AM, REED MJ. Estrogen synthesis by osteoblast cell lines. *Endocrinology* 1992; 131: 2027-9.
55. SASANO H, UZUKI M, SAWAI T, NAGURA H, MATSUNAGA G, KASHIMOTO O ET AL. Aromatase in human bone tissue. *J Bone Min Res* 1997; 12: 1416-23.
56. SHOZU M, ZHAO Y, SIMPSON ER. Estrogen biosynthesis in THP-1 cells is regulated by promoter switching of the aromatase (CYP19) gene. *Endocrinology* 1997; 138: 5125-35.
57. HEINE PA, TAYLOR JA, IWAMOTO GA, LUBAHN DB, COOKE PS. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor- α knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 12729-34.
58. JONES ME, THORBURN AW, BRITT KN, JONES ME, THORBURN AW, BRITT KL ET AL. Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 12735-40.
59. OKAZAKI R, INOUE D, SHIBATA M, SAIKA M, KIDO S, OOKA H ET AL. Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express

- estrogen receptor (ER) α or β . *Endocrinology* 2002; 143: 2349-56.
60. PINO AM, RODRÍGUEZ JM, RÍOS S, ASTUDILLO P, LEIVA L, SEITZ G ET AL. Aromatase activity of human mesenchymal stem cells is stimulated by early differentiation, vitamin D and leptin. *J Endocrinol* 2006; 191: 715-25.
61. RIGGS BI, KHOSLA S, MELTON III LJ. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev* 2002; 23: 279-302.
62. GENNARI L, NUTI R, BILEZIKIAN JP. Aromatase activity and bone homeostasis in men. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 5898-907.
63. CONSIDINE RV, SINHA MK, HEIMAN ML, KRIAUCIUNAS A, STEPHENS TW, NYCE MR ET AL. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *New Engl J Med* 1996; 334: 292-5.
64. ROSEN CJ, BOUXSEIN ML. Mechanisms of disease: is osteoporosis the obesity of bone? *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006; 2: 35-43.
65. THOMAS T, BURGUERA B. Is leptin the link between fat and bone mass? *J Bone Min Res* 2002; 17: 1563-9.
66. GLAUBER HS, VOLLMER WM, NEVITT MC, ENSRUD KE, ORWOLL ES. Body weight versus body fat distribution, adiposity, and frame size as predictors of bone density. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 1118-23.
67. KHOSLA S, ATKINSON EJ, RIGGS BL, MELTON LJ. Relationship between body composition and bone mass in women. *J Bone Min Res* 1996; 11: 857-63.
68. ISAIA GC, D'AMELIO P, DI BELLA S, TAMONE C. Is leptin the link between fat and bone mass? *J Endocrinol Invest* 2005; 28 (10 Suppl): 61-5.
69. KARSENTY G. Leptin control bone formation through a hypothalamic relay. *Rec Prog Horm Res* 2001; 56: 401-15.
70. TARTAGLIA LA. The leptin receptor. *J Biol Chem* 1997; 272: 6093-6.
71. RESELAND YE, SYVERSEN U, BAKKE I, QVIGSTAD G, EIDE LG, HJERTNER O ET AL. Leptin is expressed in and secreted from primary cultures of human osteoblasts and promotes bone mineralization. *J Bone Min Res* 2001; 16: 1426-33.
72. THOMAS T, GORI F, KHOSLA S, JENSEN MD, BURGUERA B, RIGGS BL. Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinology* 1999; 140: 1630-8.
73. LAI CF, CHAUDHARY L, FAUSTO A, HALSTEAD LR, ORY DS, AVIOLI LV ET AL. Erk is essential for growth, differentiation, integrin expression, and cell function in human osteoblastic cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 14443-50.
74. ASTUDILLO P, RÍOS S, PASTENES L, PINO AM, RODRÍGUEZ JP. Increased adipogenesis of osteoporotic human-mesenchymal stem cells (MSCs) characterizes by impaired leptin action. *J Cell Biochem* 2008; 103: 1054-65.
75. Reginato MJ, Krakow SL, Bailey ST, Lazar MA. Prostaglandins promote and block adipogenesis through opposing effects on peroxisome proliferators-activated receptor gamma. *J Biol Chem* 1998; 273: 1855-8.
76. WAITE KJ, FLOYD ZE, ARBOUR-REILY P, STEPHENS JM. Interferon- γ -induced regulation of peroxisome proliferators-activated receptor γ and STATs in adipocytes. *J Biol Chem* 2001; 276: 7062-68.
77. KALLEN CB, LAZAR MA. Antidiabetic thiazolidinedione inhibit leptin (ob) gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 5793-6.
78. PATEL NG, HOLDER JC, SMITH SA, KUMAR S, EGGO MC. Differential regulation of lipogenesis and leptin production by independent signaling pathways and rosiglitazone during human adipocyte differentiation. *Diabetes* 2003; 52: 43-50.
79. UNGER RH. Lipid overload and overflow: Metabolic trauma and the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab* 2003; 14: 398-403.