

**Delgado-Calle J, Riancho JA**

Departamento de Medicina Interna - H.U. Marqués de Valdecilla-IFIMAV-Universidad de Cantabria - Santander

## Papel de la metilación del ADN en la regulación de la osteoclastogénesis

Correspondencia: Jesús Delgado-Calle - Departamento de Medicina Interna - Hospital U.M. Valdecilla-IFIMAV-Universidad de Cantabria - Avda. Marqués de Valdecilla, s/n - 39008 Santander (España)  
Correo electrónico: [jesusdelgadocalle@gmail.com](mailto:jesusdelgadocalle@gmail.com)

Fecha de recepción: 11/01/2012

Fecha de aceptación: 30/01/2012

*Trabajo becado por la SEIOMM para asistir al 33 Congreso de la ASBMR (San Diego, 2011)*

### Resumen

Diversos estudios recientes sugieren que los mecanismos epigenéticos, como la metilación del ADN, juegan un papel crítico en la diferenciación celular. Los osteoclastos son células capaces de resorber hueso. Su diferenciación está estrictamente regulada por la vía de señalización RANKL-OPG-RANK. Recientemente nuestro grupo ha descrito que la expresión de RANKL y OPG en el linaje osteoblástico es regulada mediante la metilación de las regiones promotoras de estos genes. Esta revisión resume el conocimiento actual de cómo la metilación del ADN influye en la osteoclastogénesis.

**Palabras clave:** *epigenética, RANKL, OPG, metilación, diferenciación.*

## Role of DNA methylation in the regulation of osteogenesis

### Summary

Recent studies suggest that epigenetic mechanisms, such as the methylation of DNA, play a critical role in cellular differentiation. Osteoclasts are cells with the capability of reabsorbing bone. Their differentiation is strictly regulated by the RANKL-OPG-RANK signalling pathway. Recently, our group has reported that the expression of RANKL and OPG by cells of the osteoblastic lineage is regulated by the methylation of the promoter regions of those genes. This review summarizes current knowledge about the influence of DNA methylation on the regulation of osteoclastogenesis.

**Key words:** *epigenetic, RANKL, OPG, methylation, differentiation.*

### Introducción

Los osteoclastos son células especializadas en la resorción ósea. Estas células se forman, mediante un complejo proceso de diferenciación (la osteoclastogénesis), a partir de precursores hematopoyéticos presentes en la médula ósea<sup>1</sup>. El proceso de maduración está liderado por la inducción de la expresión de determinados genes característicos de los osteoclastos funcionales. La expresión de estos genes inicia una serie de cambios en los precursores que permiten finalmente a los osteoclastos maduros erosionar el hueso.

La actividad de los osteoclastos es imprescindible para llevar a cabo el remodelado óseo, proceso que se encarga de renovar periódicamente el tejido esquelético, sustituyendo hueso viejo por hueso nuevo<sup>2</sup>. Las alteraciones en la actividad normal de estas células tienen un importante impacto en la masa ósea, por lo que los mecanismos moleculares que dirigen la diferenciación de los precursores osteoclastóticos deben ser finamente controlados.

De un tiempo a esta parte, son varios los trabajos que comienzan a señalar el posible papel de los mecanismos epigenéticos como ejes reguladores de los procesos de diferenciación celular. Aunque todavía hay poca información disponible acerca del papel que estos mecanismos pueden tener en el hueso, varios estudios señalan la implicación de estas marcas en la regulación de la expresión de genes críticos para la biología ósea<sup>3</sup>. El objetivo de esta revisión es repasar el papel de los mecanismos epigenéticos, mas concretamente de la metilación del ADN, en el control de la osteoclastogénesis.

### La metilación del ADN

Todas las células del cuerpo humano, a excepción de las pertenecientes a la línea germinal, comparan el genoma. Sin embargo, existen diferentes tipos celulares, con diferentes funciones y comportamientos. Este hecho pone de manifiesto que deben existir mecanismos que regulan estricta-

mente el progreso desde células totipotentes hasta células totalmente diferenciadas y funcionales. Además, idealmente, dichos mecanismos deberían ser capaces de modular el progreso de la maduración en respuesta a estímulos del microambiente, promoviendo una diferenciación celular tiempo y lugar dependiente. Numerosos estudios sugieren que los mecanismos epigenéticos son capaces de regular varios de estos procesos de diferenciación celular<sup>6</sup>.

Los mecanismos epigenéticos se definen como cambios en el ADN heredables, que no afectan a la secuencia de bases, reversibles y que se manifiestan como patrones específicos de expresión génica<sup>7</sup>. A diferencia del genoma, se sabe que el epigenoma (conjunto de marcas epigenéticas) es dinámico, cambiando en respuesta al entorno, no solo celular, sino también del individuo. Por el momento se han descrito tres tipos de mecanismos epigenéticos: la metilación del ADN, la modificación post-traducciona l de histonas y los microARNs<sup>8</sup>.

La metilación del ADN es, con diferencia, el mecanismo epigenético más estudiado, quizás por su implicación en procesos neoplásicos. La metilación del ADN es llevada a cabo por unas enzimas conocidas como ADN metil transferasas (DNMTs). En mamíferos, las DNMTs catalizan la adición de un grupo metilo en la posición 5' de citosinas que preceden a guaninas, dinucleótidos conocidos como CpGs<sup>9</sup>. De forma general, estos CpGs aparecen metilados. Existen determinadas regiones enriquecidas en CpGs, conocidas como islas CpG, que aparecen preferentemente en regiones cercanas a los promotores génicos o en los propios promotores. Curiosamente, estas regiones suelen estar generalmente desmetiladas, y su patrón de metilación puede cambiar entre los distintos tipos celulares<sup>10</sup>.

En líneas generales, se puede considerar que la metilación del ADN tiene un papel represor sobre regiones promotoras con islas CpG, bloqueando la expresión génica<sup>11</sup>. Aunque por el momento no se

conocen con certeza los mecanismos por los cuales la metilación es capaz de modular la expresión de un gen, hay datos que sugieren que la presencia de grupos metilo dificulta la unión de factores de transcripción a sus secuencias diana, dificultando así el inicio de la transcripción<sup>12</sup>. Por otro lado, la presencia de estos grupos metilo es capaz de promover cambios en la conformación de la cromatina, haciendo que determinadas regiones críticas para el inicio de la transcripción sean menos accesibles (Figura 1)<sup>13</sup>.

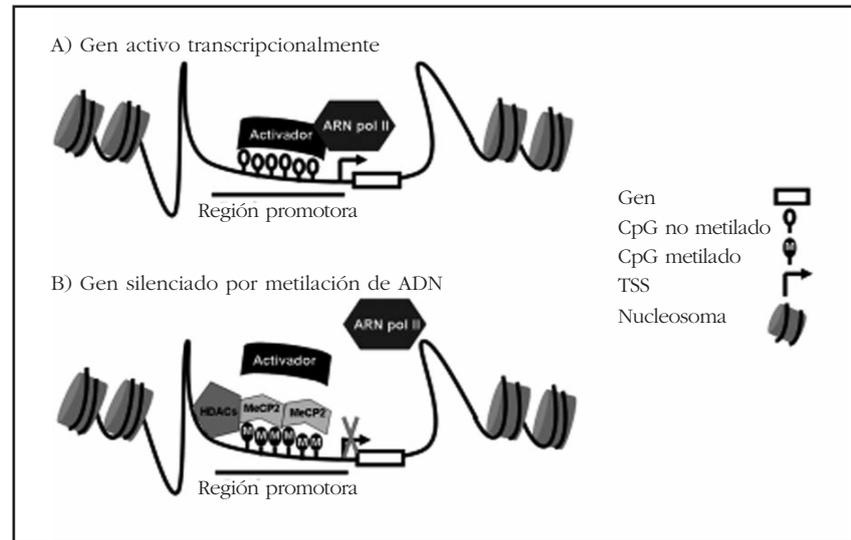
Es importante comentar que la metilación no sólo tiene un papel importante como reguladora de la expresión génica. De hecho, como se ha comentado anteriormente, la mayor parte de los CpGs aparecen metilados, independientemente de si su localización es exónica, intrónica o intergénica. Se cree que la metilación de estas zonas contribuye de una manera importante a la estabilidad del genoma<sup>14</sup>.

El papel de los mecanismos epigenéticos en el hueso, y en concreto el de la metilación del ADN, está empezando a ser estudiado recientemente. Sin embargo, como ya se ha comentado, existen varias evidencias que invitan a pensar que estos mecanismos pueden ser importantes en la biología ósea<sup>15</sup>. En este sentido, se sabe que la metilación del ADN regula el avance de la diferenciación de los precursores osteoblásticos, además de regular la expresión de varios genes implicados en la homeostasis ósea<sup>16-18</sup>. Por el contrario, poco se sabe sobre el papel que la metilación del ADN tiene sobre la regulación de la osteoclastogénesis.

### Regulación epigenética de la osteoclastogénesis: metilación del ADN

El proceso de diferenciación de un osteoclasto a partir de células del linaje hematopoyético monocito-macrófago ocurre generalmente cerca de la superficie ósea. Actualmente se sabe que hay dos citocinas esenciales para una correcta diferenciación osteoclástica: el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y el activador del receptor del factor nuclear  $\kappa$ B (RANKL)<sup>19,20</sup>. RANKL es una proteína producida por varios tipos celulares. Aunque hasta hace poco se consideraba que los osteoblastos eran la principal fuente de RANKL en el entorno óseo, recientemente se ha propuesto que los osteocitos también pueden producir

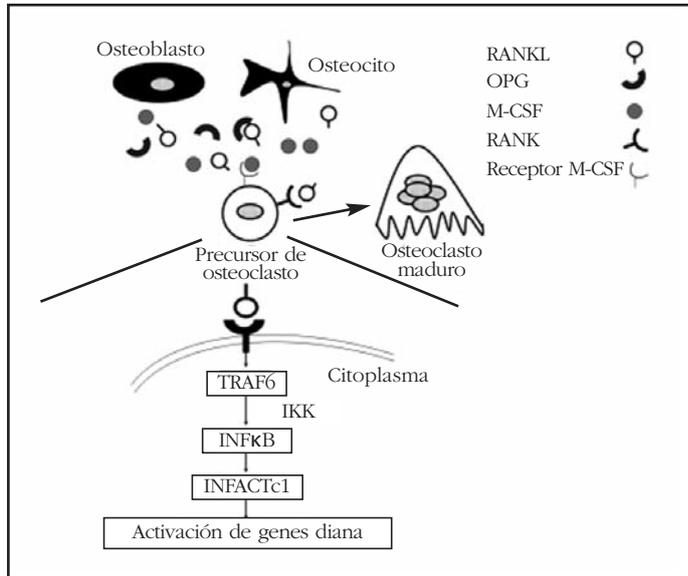
Figura 1. Silenciamiento de la expresión génica mediante la metilación de dinucleótidos CpG en regiones promotoras. A) En ausencia de grupos metilo en los CpGs localizados en la región promotora, los factores activadores de la transcripción son capaces de unirse a sus secuencias diana y reclutar a la ARN polimerasa II para el comienzo de la transcripción. B) En presencia de grupos metilo, éstos son reconocidos por las proteínas MeCP2, que bloquean la unión de factores de transcripción a sus secuencias diana, impidiendo el comienzo de la transcripción. Además, las proteínas MeCP2 son capaces de reclutar enzimas histona deacetilasa (HDAC) que se encargan del remodelado de la cromatina, induciendo una conformación menos accesible



activamente esta proteína<sup>21</sup>. La unión de RANKL al receptor activador del factor nuclear  $\kappa$ B (RANK), presente en los precursores de los osteoclastos, desencadena una serie de mecanismos moleculares que promueven el inicio y avance de la diferenciación de los precursores de los osteoclastos (Figura 2)<sup>22</sup>. Básicamente, tras la interacción entre RANKL y RANK, éste último es activado y la señal es transducida al interior celular a través del complejo de señalización TRAF- $\text{IKK}$ - $\text{NF}\kappa\text{B}$ , consiguiendo activar en último término el factor de transcripción conocido como factor nuclear de células T activadas c1 (NFATc1)<sup>23,24</sup>. Este último, en cooperación con otros factores, induce los genes específicos que determinan el fenotipo osteoclástico. Por otro lado, además de RANKL, los osteoblastos también son capaces de producir OPG, una proteína capaz de unirse a RANKL y bloquear su interacción con RANK<sup>22,25</sup>. De hecho, la relación entre la producción de RANKL y OPG se considera como un determinante importante de la tasa de osteoclastogénesis.

Dado su papel clave en este proceso, RANKL se ha convertido en una diana terapéutica valiosa de cara al tratamiento de enfermedades esqueléticas prevalentes en las que la masa ósea se ve alterada. De hecho, varios estudios recientes han demostrado cómo el bloqueo de RANKL mediante anticuerpos neutralizantes consigue aumentar la masa ósea en pacientes<sup>26</sup>. A pesar de su importancia, por el momento no se sabe con certeza qué mecanismos moleculares regulan su expresión. En

Figura 2. Vía de señalización RANKL-RANK en la diferenciación celular de precursores de osteoclasto. Los osteoblastos y los osteocitos producen y secretan al medio RANKL. La interacción de RANKL con su receptor RANK, desencadena toda una serie de reacciones moleculares en el citoplasma del precursor osteoclasto. En último término, el factor de transcripción NFATc1 es activado. Este factor, junto con otros, induce la expresión de varios genes diana que dirigen la diferenciación de los precursores hacia osteoclastos maduros



este sentido, nuestro grupo ha propuesto recientemente que la expresión de RANKL y de OPG es regulada mediante la metilación de las regiones promotoras de estos genes<sup>27</sup>.

Mediante un análisis bioinformático, identificamos dos islas CpG en el gen RANKL, una localizada sobre la TSS de la isoforma I (CpG 1), y otra localizada unas pocas bases antes del inicio del gen (CpG 2). Por otro lado, también identificamos otra isla CpG en el gen OPG. Tras el análisis de la expresión y el grado de metilación en varias líneas celulares osteoblásticas observamos que la expresión de RANKL se asociaba inversamente con el grado de metilación de la isla 1, pero no con el de la isla 2. Del mismo modo, la expresión de OPG se asociaba inversamente con el grado de metilación en la isla encontrada. El tratamiento de células que previamente no producían RANKL ni OPG, y presentaban unos niveles de metilación elevados con un agente desmetilante, provocó una bajada de un 15% en los niveles de metilación de las islas estudiadas. Paralelamente a esta bajada en la metilación, el tratamiento indujo la expresión de ambos genes, confirmando la relación existente entre el grado de metilación y la expresión. Por otro lado, observamos que la expresión de RANKL, así como el cociente RANKL/OPG, era significativamente mayor en el tejido óseo procedente de pacientes osteoporóticos que en el de pacientes artrósicos. Sin embargo, las islas seleccionadas para el estudio aparecieron hipometiladas en el tejido óseo, y no encontramos diferencias entre los dos grupos de

pacientes. En conjunto, nuestros resultados sugieren que existe una asociación entre los niveles de expresión de estos genes y la metilación de sus islas CpG, de forma que niveles bajos de metilación permitirían la expresión de RANKL, y la consecuente inducción de la osteoclastogénesis<sup>27</sup>.

Es importante mencionar que, además del papel directo de la metilación de las islas CpG de RANKL y OPG sobre la activación de la osteoclastogénesis, se han descrito otros mecanismos epigenéticos implicados en el proceso. Por un lado, se ha demostrado que la desmetilación de residuos de histonas en el gen NFATc1 juega un papel crítico en la progresión de la diferenciación de los precursores de los osteoclastos<sup>28</sup>. Por otro lado, son varios los trabajos que sugieren que la producción de ciertos microARNs está implicada también en la regulación de la diferenciación de los osteoclastos<sup>29,30</sup>.

## Conclusiones

El aumento en la esperanza de vida en la sociedad actual ha provocado un incremento en el número de pacientes que padecen enfermedades asociadas al envejecimiento. Dentro de éstas, la osteoporosis es una de las enfermedades más

representativas. La mayor parte de los tratamientos actuales se centran en la modulación de la resorción ósea, reduciendo así la pérdida de masa ósea. Por lo tanto, conocer con mayor profundidad los mecanismos de la vía de señalización RANKL-OPG-RANK, eje regulador de la formación de osteoclastos, es de vital importancia. En este sentido, los mecanismos epigenéticos parecen estar involucrados en este proceso de diferenciación celular. La identificación y el estudio de este tipo de mecanismos permitirá identificar nuevas dianas terapéuticas, así como entender mejor la patogenia y la fisiopatología de la osteoporosis.

Por otro lado, diversos estudios epidemiológicos sugieren que los mecanismos epigenéticos, y en concreto la metilación del ADN, pueden también estar implicados en la relación entre el genoma y el entorno, relación que en muchas ocasiones es determinante para el desarrollo de enfermedades esqueléticas<sup>31,32</sup>. Aunque por el momento no se ha encontrado una relación directa entre los perfiles epigenéticos y deficiencias óseas, no se puede descartar que la identificación de marcas epigenéticas específicas asociadas a enfermedades esqueléticas pueden ser útiles en el futuro para el diagnóstico y la prevención.

En conjunto, aunque los datos son todavía escasos, los estudios existentes permiten aventurar que la epigenética será un tema importante en el campo de la investigación ósea y en el desarrollo de nuevos fármacos antiresortivos en los próximos años.

**Financiación:** Jesús Delgado-Calle tiene una beca predoctoral del IFIMAV. La investigación en epigenética en nuestro laboratorio está financiada con una beca del Instituto de Salud Carlos III-Fondo de Investigaciones Sanitarias (09/539). Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

### Bibliografía

- Vaananen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM. The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci* 2000;113(Pt 3):377-81.
- Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1092:385-96.
- Delgado-Calle J, Sanudo C, Bolado A, Fernández A, Arozamena J, Pascual-Carra MA, et al. DNA methylation contributes to the regulation of sclerostin expression in human osteocytes. *J Bone Miner Res* 2012; en prensa.
- Delgado-Calle J, Sanudo C, Sánchez-Verde L, García-Renedo RJ, Arozamena J, Riancho JA. Epigenetic regulation of alkaline phosphatase in human cells of the osteoblastic lineage. *Bone* 2011;49:830-8.
- Demura M, Bulun SE. CpG dinucleotide methylation of the CYP19 1.3/II promoter modulates cAMP-stimulated aromatase activity. *Mol Cell Endocrinol* 2008;283:127-32.
- Lunyak VV, Rosenfeld MG. Epigenetic regulation of stem cell fate. *Hum Mol Genet* 2008;17:R28-R36.
- Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008;358:1148-59.
- Esteller M. Cancer Epigenetics for the 21st Century: What's Next? *Genes Cancer* 2011;2:604-6.
- Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 2000;9:2395-402.
- Meissner A, Mikkelsen TS, Gu H, Wernig M, Hanna J, Sivachenko A, et al. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature* 2008;454:766-70.
- Miranda TB, Jones PA. DNA methylation: the nuts and bolts of repression. *J Cell Physiol* 2007;213:384-90.
- Bogdanovic O, Veenstra GJ. DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma* 2009;118:549-65.
- Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 1998;19:187-91.
- Weber M, Schubeler D. Genomic patterns of DNA methylation: targets and function of an epigenetic mark. *Curr Opin Cell Biol* 2007;19:273-80.
- Delgado-Calle J, Garmilla P, Riancho JA. Do epigenetic marks govern bone homeostasis? *Curr Genomics* 2012; en prensa.
- Kang MI, Kim HS, Jung YC, Kim YH, Hong SJ, Kim MK, et al. Transitional CpG methylation between promoters and retroelements of tissue-specific genes during human mesenchymal cell differentiation. *J Cell Biochem* 2007;102:224-39.
- Arnsdorf EJ, Tummala P, Castillo AB, Zhang F, Jacobs CR. The epigenetic mechanism of mechanically induced osteogenic differentiation. *J Biomech* 2010;43:2881-6.
- Boquest AC, Noer A, Collas P. Epigenetic programming of mesenchymal stem cells from human adipose tissue. *Stem Cell Rev* 2006;2:319-29.
- Tanaka S, Takahashi N, Udagawa N, Tamura T, Akatsu T, Stanley ER, et al. Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. *J Clin Invest* 1993;91:257-63.
- Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:3597-602.
- Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med* 2011;17:1231-4.
- Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys* 2008;473:139-46.
- Zhao Q, Wang X, Liu Y, He A, Jia R. NFATc1: functions in osteoclasts. *Int J Biochem Cell Biol* 2010;42:576-9.
- Armstrong AP, Tometsko ME, Glaccum M, Sutherland CL, Cosman D, Dougall WC. A RANK/TRAF6-dependent signal transduction pathway is essential for osteoclast cytoskeletal organization and resorptive function. *J Biol Chem* 2002;277:44347-56.
- Aoki S, Honma M, Kariya Y, Nakamichi Y, Ninomiya T, Takahashi N, et al. Function of OPG as a traffic regulator for RANKL is crucial for controlled osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res* 2010;25:1907-21.
- Genant HK, Engelke K, Hanley DA, Brown JP, Omizo M, Bone HG, et al. Denosumab improves density and strength parameters as measured by QCT of the radius in postmenopausal women with low bone mineral density. *Bone* 2010;47:131-9.
- Delgado-Calle J, Sanudo C, Fernandez AF, Garcia-Renedo R, Fraga MF, Riancho JA. Role of DNA methylation in the regulation of the RANKL-OPG system in human bone. *Epigenetics* 2012; en prensa.
- Yasui T, Hirose J, Tsutsumi S, Nakamura K, Aburatani H, Tanaka S. Epigenetic regulation of osteoclast differentiation: Possible involvement of Jmjd3 in the histone demethylation of Nfatc1. *J Bone Miner Res* 2011;26:2665-71.
- Mizoguchi F, Izu Y, Hayata T, Hemmi H, Nakashima K, Nakamura T, et al. Osteoclast-specific Dicer gene deficiency suppresses osteoclastic bone resorption. *J Cell Biochem* 2010;109:866-75.
- Sugatani T, Vacher J, Hruska KA. A microRNA expression signature of osteoclastogenesis. *Blood* 2011;117:3648-57.
- Holroyd C, Harvey N, Dennison E, Cooper C. Epigenetic influences in the developmental origins of osteoporosis. *Osteoporos Int* 2012;23:401-10.
- Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ, Susser ES, et al. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:17046-9.