

Especies reactivas de oxígeno y su efecto sobre la actividad de las células óseas*

Reactive oxygen species on bone cells activity

Espécies reativas de oxigênio e seu efeito na atividade das células ósseas

► Clarisa Marotte¹, Susana Noemí Zeni²

¹ Dra. en Ciencias Biológicas.

² Dra en Ciencias Químicas.

* Laboratorio de Enfermedades Metabólicas Óseas. Hospital de Clínicas. Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM). CONICET-UBA. Buenos Aires, Argentina

Resumen

Las mitocondrias generan especies reactivas de oxígeno (ERO) que cumplen con una multiplicidad de procesos celulares; cuando se producen en exceso son responsables del estrés oxidativo y de múltiples procesos patológicos, incluyendo osteoporosis. Los factores de transcripción FoxO 1, 3 y 4 actúan como moléculas sensoras de ERO convirtiendo la señal de estrés oxidativo en la inducción de mecanismos de protección o señales apoptóticas. La insulina y los factores de crecimiento insulínicos (IGFs) regulan negativamente a FoxOs en mamíferos. Las ERO están involucradas en el remodelamiento óseo a través del efecto que ejercen sobre osteoblastos y osteoclastos. Los FoxOs controlan la acción de ERO sobre la osteoblastogénesis y la osteoclastogénesis. Con la edad, el aumento del estrés oxidativo acelera la adipogénesis a expensas de la osteoblastogénesis, al mismo tiempo que aumenta la oxidación de ácidos grasos generando compuestos pro-oxidantes que incrementan el estrés oxidativo. Asimismo, la caída estrogénica acelera la osteoclastogénesis por vía genómica o no genómica. Dada la importancia de FoxOs y ERO en la fisiología ósea y durante el envejecimiento, clarificar los eventos celulares y pasos moleculares involucrados en el control del estrés oxidativo sería vital para entender la regulación de la osteoporosis relacionada a la edad.

Palabras clave: especies reactivas de oxígeno * osteoblastos * osteoclastos * remodelamiento óseo * factores de transcripción sensibles a reacciones redox * estrés oxidativo * osteoporosis

Summary

Reactive oxygen species (ROS) are key players in oxidative stress, and they are generated as by-products of cellular metabolism, primarily in the mitochondria. ROS are well recognised for playing a dual role as both deleterious and beneficial species. FoxOs transcription factors are activated in oxidative stress responses and participate in the regulation of cellular functions, including cell cycle arrest, cell death, and protection from stress stimuli. FoxO activity is inhibited by growth factors and the insulin signaling pathways. They play a fundamental role in skeletal homeostasis by exerting both ROS

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

dependent and independent effects on bone cells. FoxOs modulate osteoblastogenesis and attenuate osteoclastogenesis through both cell autonomous and indirect mechanisms. With aging there is an inevitable increment in oxidative stress that accelerates adipogenesis at the expense of osteoblastogenesis. There is also an increment in lipid oxidation to form pro-oxidant products that enhance oxidative stress generation. In addition, the estrogen withdrawal accelerates osteoclastogenesis. Given the importance of both FoxOs and ROS in aging and bone biology, understanding the cellular events and molecular pathways that are controlled by FoxOs during aging may be vital to our understanding of the regulation of age-related osteoporosis.

Key words: *reactive oxygen species * osteoblasts * osteoclasts * bone remodeling * redox-sensitive transcription factors * oxidative stress * osteoporosis*

Resumo

Mitocôndrias geram espécies reativas de oxigênio (ERO) que cumprem uma grande variedade de processos celulares; se produzidas em excesso são responsáveis pelo estresse oxidativo e por múltiplos processos patológicos, incluindo a osteoporose. Os fatores de transcrição FoxO 1.3 e 4 funcionam como moléculas sensoras de ERO transformando o sinal de estresse oxidativo na indução de mecanismos de proteção ou sinais apoptóticos. A insulina e os fatores de crescimento insulínicos (IGFs) regulam em forma negativa Foxos em mamíferos. As ERO estão envolvidos na remodelação óssea através do seu efeito nos osteoblastos e osteoclastos. Os Foxos controlam a ação de ERO na osteoblastogênese e na osteoclastogênese. Com a idade, o aumento do estresse oxidativo acelera a adipogênese à custa de osteoblastogênese; ao mesmo tempo que aumentam a oxidação de ácidos graxos gerando compostos pró-oxidantes que incrementam o estresse oxidativo. Além disso, a queda estrogênica acelera a osteoclastogênese por via genômica ou não genômica. Devido à importância de FoxOs e ERO na fisiologia óssea e durante o envelhecimento, esclarecer os eventos celulares e passos moleculares envolvidos no controle do estresse oxidativo seria vital para a compreensão da regulação da osteoporose relacionada com a idade.

Palavras chave: *espécies reativas de oxigênio * osteoblastos * osteoclastos * remodelação óssea * fatores de transcrição sensíveis a reações redox * estresse oxidativo * osteoporose*

Introducción

Hacia finales del siglo XIX, Paul Bert demostró el fenómeno de la toxicidad del oxígeno en animales; sin embargo, se requirieron varias décadas para darle una explicación científica. En un principio, dicha toxicidad fue asociada a las altas tensiones de oxígeno; más adelante se demostró que aún bajo tensiones normales, al ser utilizado por las células se generan especies reactivas de oxígeno (ERO) intracelulares, responsables del efecto detrimental que ocurre en los sistemas biológicos. Este hallazgo llevó a la conclusión de que la formación de ERO es una consecuencia inevitable de la vida en un ambiente rico en oxígeno (1-3).

Durante la respiración oxidativa las mitocondrias de los organismos aeróbicos reducen univalentemente al oxígeno; en dicho proceso se generan ERO debido a una reducción incompleta ya que los electrones libres se unen al oxígeno molecular generando moléculas reactivas e inestables como ion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (HO^{\cdot}) (4-6) (Fig. 1). El $O_2^{\cdot-}$ es considerado la fuente primaria de ERO pero reacciona con otras moléculas generando especies secundarias más agresivas y reactivas. El H_2O_2 debido a su mayor estabilidad y concentración molar

intracelular es la ERO con mayor actividad oxidativa y, si bien no es un radical libre, puede difundir a otras localizaciones celulares dando lugar a HO^{\cdot} , extendiendo así el daño oxidativo. Otras ERO de probable relevancia producida en menor medida por las mitocondrias son el radical perhidroxilo (HO_2^{\cdot}), particularmente aquellos generados en la cercanía de las membranas, el óxido nítrico (NO) y el oxígeno singulete (1O_2). Aunque la producción de NO mitocondrial es inferior a la de H_2O_2 , ambas especies pueden reaccionar entre sí generando otras especies reactivas de nitrógeno más potentes, como el peroxinitrito ($ONOO^-$), que también pueden modificar macromoléculas (7).

Aproximadamente entre el 1% y 3% del oxígeno consumido por la mitocondria es convertido en ERO lo cual hace que dicha organela sea la responsable de generar el 90% de las ERO intracelulares (8). Sin embargo, existen otras fuentes endógenas de menor producción, entre las que se encuentran los peroxisomas, la activación de células fagocíticas y la acción de ciertos sistemas enzimáticos. Los peroxisomas contienen oxidadasas que, como aquellas que participan en la β -oxidación peroxisomal de los ácidos grasos, tienen una gran capacidad para generar H_2O_2 . En el sistema inmunológico, y en especial en la activación de las células

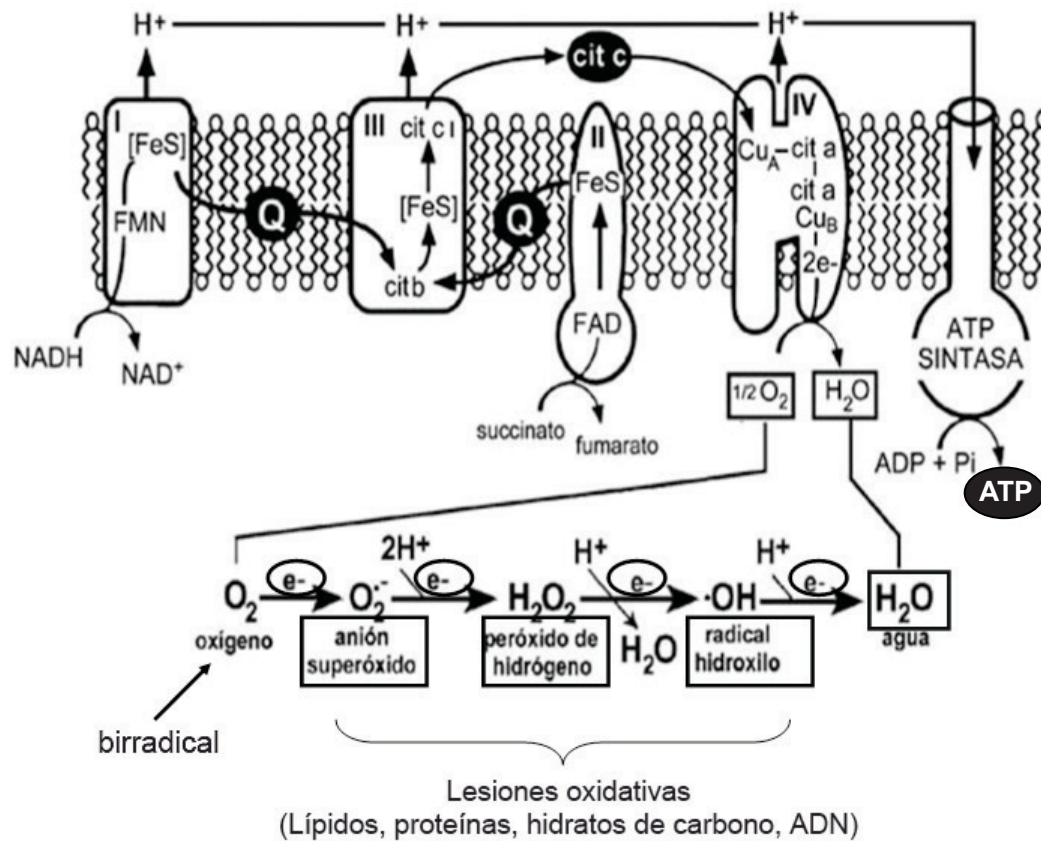


Figura 1. Transporte mitocondrial como generador de ERO.

las fagocíticas, la actividad de NADPH oxidasa unida a membranas genera una importante cantidad de H₂O₂. La enzima presente en las células no fagocíticas es de naturaleza estructural y genéticamente diferente, por lo cual apenas genera el 1% de lo que se produce en las células fagocíticas (1) (9-10). Ciertas enzimas como la xantina oxidasa, el sistema de detoxificación hepática del citocromo P450, la acil CoA oxidasa, las NADPH/NADH oxidasas y la acil CoA oxidasa son también fuentes endógenas de producción de O₂⁻ y de H₂O₂. Las ERO, además, pueden ser generadas en respuesta a estímulos externos, como: citoquinas proinflamatorias, factores de crecimiento, toxinas ambientales, luz UV, radiaciones ionizantes, entre otros (2).

Si bien cuando se producen en forma excesiva las ERO inducen estrés oxidativo y con ello efectos detrimentales (5), a bajas concentraciones son beneficiosas para los seres vivos, ya que participan en diversos aspectos de señalización y regulación intracelular (11). En este sentido, las ERO pueden regular importantes procesos fisiológicos dependiendo del tipo de célula, del oxidante que las genere, de su intensidad y del tiempo de desequilibrio redox. Las ERO modulan diversas vías de señalización influenciando la síntesis de enzimas antioxidantes, los procesos de reparación, la inflamación y las transformaciones oncogénicas. En este último caso,

actuando sobre distintos estadios del ciclo celular, controlan la migración, la proliferación, la supervivencia y la apoptosis.

MECANISMOS DE DEFENSA FRENTE A LA PRODUCCIÓN EXAGERADA DE ERO

La exposición a una producción continua de ERO conduciría a una alteración en la homeostasis de óxido-reducción intracelular que desencadenaría estrés oxidativo; por ello, las células desarrollan una batería de mecanismos de defensa adaptativos de prevención, reparación y antioxidantes (10). Los mecanismos de defensa antioxidante pueden ser de naturaleza enzimática y no enzimática. Los enzimáticos incluyen a la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) cuya síntesis puede modificarse por ejercicio, dieta y edad (2). La SOD elimina el O₂⁻ convirtiéndolo en oxígeno y H₂O₂. Existen diferentes formas de la enzima; aquella que contiene manganeso (Mn) se encuentra en la matriz mitocondrial y es esencial para la vida. Por sí sola la SOD no es un antioxidante porque produce H₂O₂; la CAT descompone dicha molécula con alta velocidad y la GPx, conteniendo o no selenio (Se) en su constitución, es complementaria de la CAT, ya que descompone al H₂O₂ con baja intensidad pero con alta afinidad. Estas enzimas utilizan al gluta-

ción (GSH), antioxidante no enzimático, como agente reductor generando GSH oxidado (GSSG) que es altamente tóxico para la célula. La glutatión reductasa (GSR), otra enzima antioxidante, lo regenera nuevamente a expensas de NADPH (12). En células y tejidos se encuentran presentes otros antioxidantes no enzimáticos, además del GSH: ubiquinonas (coenzima Q), bilirrubina, albúmina, ferritina, ceruloplasmina y ácido úrico. Dentro de los antioxidantes no enzimáticos que se incorporan en el humano por la dieta se pueden mencionar al β -caroteno o provitamina A; a las vitaminas C (ácido ascórbico) y E (α -tocoferol); a los polifenoles antioxidantes presentes en frutas y verduras (flavonoides, ácidos fenólicos y taninos) que colaboran en la prevención eliminando radicales libres, y ciertos micronutrientes minerales que actúan como cofactores enzimáticos (Cu, Se, Mg, Zn).

La presencia de toda esta multiplicidad de antioxidantes tisulares de fuentes tanto endógenas como exógenas ayuda a controlar el estrés oxidativo *in vivo*. Sin embargo, dichas defensas no presentan un 100% de eficiencia, lo que se traduce en la producción de cierto nivel de daño oxidativo, aún en ausencia de patologías. Dichos daños aumentan con la edad y afectan a lípidos, proteínas y ADN. El aumento del daño oxidativo en las proteínas se ha demostrado por la presencia de compuestos de tipo carbonílicos o de productos de entrecruzamiento como ditirosina. Respecto de los lípidos, las membranas biológicas son ricas en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), vulnerables a la peroxidación lipídica por acción de radicales libres. Los peróxidos cíclicos y radicales hidropéroxidos ($\text{HOO}\cdot$) producidos dan lugar a una reacción de propagación en cadena que se amplifica por la presencia en el plasma de metales de transición. Las ERO pueden atacar directamente al ADN a nivel de sus bases o del azúcar-fosfato modificando la estructura de las purinas y pirimidinas (11). Todos estos procesos están limitados debido a la presencia de sistemas de reparación del daño oxidativo, si bien debe tenerse en cuenta que la continua generación de moléculas modificadas puede dar lugar a consecuencias negativas e irreparables a lo largo de la vida. A modo de ejemplo, el daño en las proteínas puede repararse por recambio celular utilizando la codificación contenida en el ADN; sin embargo, las mutaciones que en él ocurren pueden impedir la recuperación de la información transmitida por la replicación del ADN mitocondrial (mtADN) para transformarse en una proteína determinada. La acumulación de mutaciones en el mtADN que ocurre con el tiempo sería la principal causa de los cambios observados durante el envejecimiento.

El envejecimiento ha sido definido como el resultado de la acumulación progresiva de efectos deletéreos que reducen la habilidad del organismo para resistir situaciones de estrés y que disminuyen la posibilidad de sobrevivir (13). En 1956 Harman D (14) propu-

so su teoría acerca del envejecimiento según la cual las ERO, que se generan endógenamente durante la respiración tisular, serían las responsables de dicho proceso. Asimismo, las ERO también estarían involucradas en varios desórdenes degenerativos asociados a la edad tales como ciertas enfermedades neurodegenerativas (ej. Parkinson y Alzheimer), aterosclerosis, cáncer, diabetes, osteoporosis (9) (15). Como en ausencia de patologías la mitocondria es la principal fuente de ERO, dicha teoría es conocida como "teoría del envejecimiento de los radicales libres mitocondriales" (14).

MECANISMOS DE DEFENSA FRENTE AL ESTRÉS OXIDATIVO

En el sitio donde las ERO son generadas existen moléculas sensoras que convierten la señal de estrés oxidativo en la inducción de mecanismos de protección o señales apoptóticas. Dichos sensores son activados por O_2^- o H_2O_2 , los cuales regulan a diversas enzimas que contienen hierro (Fe) y grupos sulfhidrúlicos (-SH) en sus centros activos. Los grupos -SH de los residuos de cisteína (Cis) de los centros activos de diversas fosfatasa, quinasas y factores de transcripción son directamente oxidados en forma reversible por el H_2O_2 (5).

Los FoxOs, factores de transcripción sensibles a reacciones redox, constituyen una de las moléculas sensoras de daño oxidativo. Los FoxOs pertenecen a una gran familia de proteínas que se caracteriza por la presencia de dominios llamados *forkhead box* de unión al ADN mediante los cuales inician la transcripción de una gran cantidad de genes. En mamíferos existen cuatro miembros de la familia FoxO: 1, 3 y 4, ampliamente distribuidos y con un patrón de expresión superpuesto tanto en tejidos en desarrollo como en tejidos adultos y FoxO6, restringido a estructuras específicas del cerebro en desarrollo (16)(17). Estos factores, a través de la activación de moléculas de señalización como la proteína p66^{sch} , convierten el estímulo de estrés oxidativo en programas dinámicos de expresión génica de varios procesos fisiológicos y patológicos (17).

Los FoxOs, como un mecanismo celular de defensa preventivo frente a procesos oxidativos, presentan la habilidad de regular positivamente la actividad de SOD y CAT pero también la de genes como Gadd45 involucrados en la reparación del ADN (18). Los FoxOs se ubican en el núcleo o citoplasma celular, dependiendo de fosforilaciones activantes o inhibitorias en diferentes sitios específicos de la molécula llevadas a cabo por una multitud de quinasas (5). La actividad de dichas quinasas se encuentra regulada por las ERO, el receptor de insulina (RIns) y la vía de las proteínas *wingless* (Wnt). Otras modificaciones postraduccionales que modifican la localización celular de FoxOs son la acetilación y la ubiquitinación (19-21) (Fig. 3).

REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE FoxOs

La insulina y los factores de crecimiento insulínicos (IGFs) regulan negativamente a FoxO 1, 3 y 4 de mamíferos. La unión de dichos factores a su receptor activa, a través del factor de transcripción DAF 16, a diversas enzimas incluyendo a la de la vía fosfatidil-inositol-3-quinasa y serina/treonina Akt quinasa (PI-3K/Akt), y a la quinasa inducible por glucocorticoides séricos (SGK) (20). La fosforilación de FoxOs por dichas quinasas favorece su retención en el citoplasma donde es captado y degradado por el proteosoma; por ej.: Akt fosforila directamente a FoxOs en tres residuos diferentes que evitan su unión al ADN por lo cual se produce la salida hacia el citoplasma (2) (22-26). La activación por factores externos de las ERK-quinasa induce la fosforilación de FoxOs en múltiples residuos lo que lleva a la ubiquitinación del factor y su degradación proteosomal. Otros reguladores negativos de la actividad de FoxOs son la quinasa inhibidora del factor nuclear-kB (IκB) y Pin1 (27) (Fig. 2).

Por otra parte, niveles bajos de ERO y varios estímulos pro-apoptóticos rápidamente generan mecanismos de supervivencia favoreciendo la traslocación de FoxOs al núcleo y con ello la transcripción de diversos genes (28). La retención nuclear de FoxOs ocurre mediante fosforilaciones, monoubiquitinaciones, acetilaciones/desacetilaciones o la oxidación de la Cis (19). Las fosforilaciones son inducidas por la actividad de la c-Jun-N-terminal-quinasa-(JNK) o por la quinasa Mst1. La JNK es el mayor inductor de la actividad transcripcional de ERO ya que, además, fosforila al receptor de insulina y con ello suprime el efecto inhibitorio de insulina/

factores de crecimiento fibroblásticos (FGFs) evitando la acción negativa de Akt sobre los FoxOs (29). En el proceso de acetilación/desacetilación participa la acetiltransferasa de las proteínas de unión de CREB y la deacetilasa Sirt1 dependiente de NAD (19) (Fig. 3).

En respuesta a la exagerada producción de ERO, la actividad transcripcional de FoxOs puede controlar la expresión de genes involucrados en la resistencia al estrés oxidativo (MnSOD), en la reparación del DNA (Gadd45), en modificaciones del ciclo celular (ciclinas D1 y D2), en el arresto celular (p27kip1), y en la apoptosis (ligandos Bim y Fas) (5) (17) (20) (27) (28) (30) (31) (Fig. 3).

La presencia de FoxOs en el núcleo permite, además, la interacción con otros factores de transcripción como la β-catenina, el receptor γ activado por el proliferador del peroxisoma (PPAR) γ, el receptor estrogénico (RE) α o el receptor androgénico (AR) (32). Al unirse a β-catenina modifica la formación ósea; al unirse a PPARγ, los FoxOs inhiben la adipogénesis en el estadio de preadipocitos (33). La asociación directa entre AR y FoxOs bloquea la unión de FoxOs al ADN limitando su actividad y, recíprocamente, FoxOs suprimen la acción androgénica (32). FoxOs también interactúan con REα y en forma similar a AR, dicha unión reprime la función transcripcional de FoxOs (33) (Fig. 3).

EFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO SOBRE EL REMODELAMIENTO ÓSEO

El hueso es un tejido que se renueva continuamente a través del mecanismo denominado remodelamiento óseo. Dicho mecanismo está formado por dos proce-

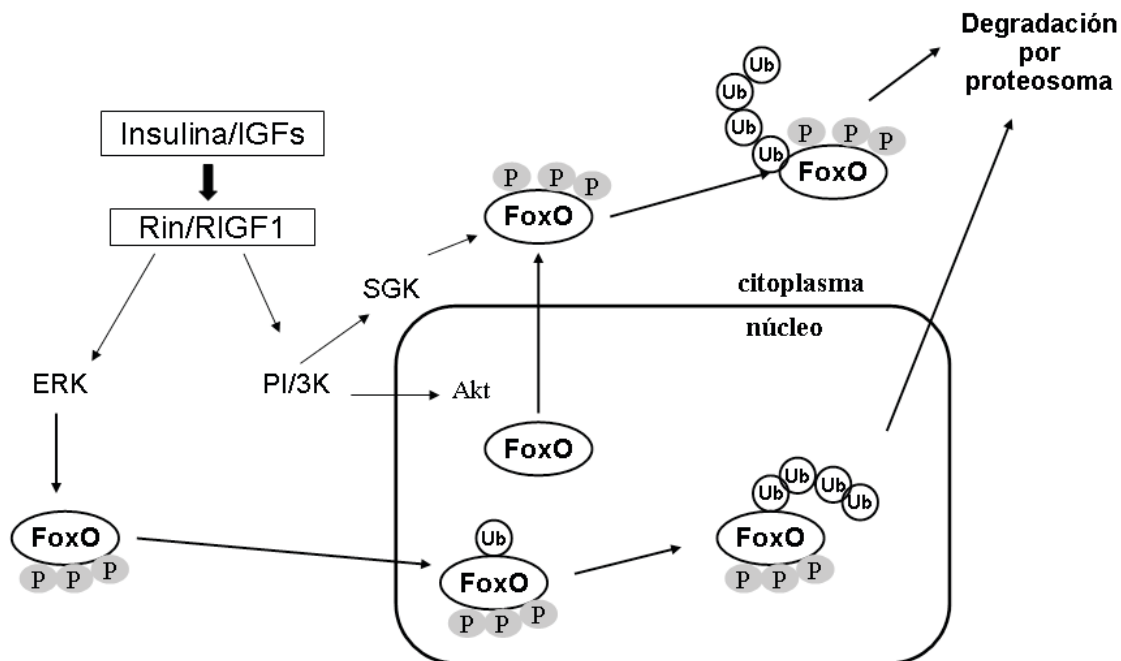
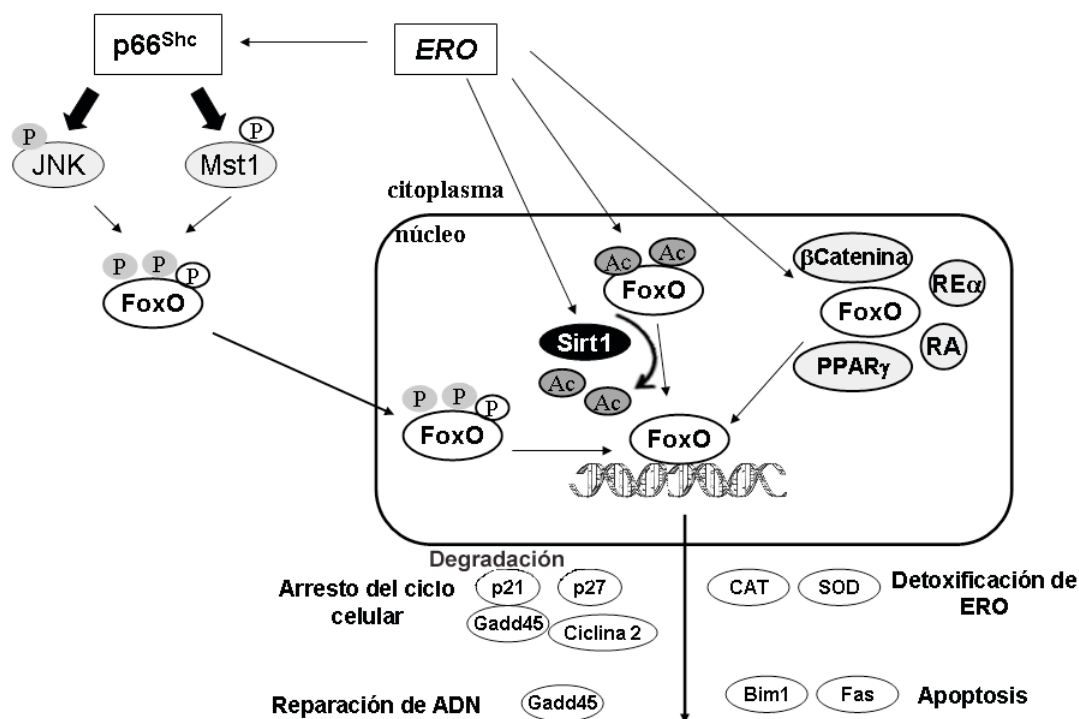


Figura 2. Degradación de FoxOs.



Modificado de Almeida M. Ref. 27

Figura 3. Activación de FoxOs.

Los osteoclastos también liberan factores que regulan la proliferación, diferenciación y actividad del osteoblasto. Las Wnt son una gran familia de glucoproteínas secretadas por el osteoclasto que se unen a su receptor *frizzled* (*fz*) y a los correceptores constituidos por las proteínas relacionadas al receptor de lipopro-

teína de baja densidad 5 o 6 (LRP5 o 6), presentes en la membrana del osteoblasto, favoreciendo su proliferación, diferenciación y actividad y, en consecuencia, la formación ósea (35-39) (Fig. 4).

El estrés oxidativo está involucrado en los procesos de formación y resorción a través del efecto que ejercen las ERO sobre los osteoblastos y osteoclastos (40). En este sentido, las ERO activan distintas vías y desarrollan un amplio espectro de respuestas que, dependiendo del tipo de célula ósea, puede desencadenar su proliferación y crecimiento, el arresto de su ciclo celular y por lo tanto su diferenciación, o su apoptosis (41).

El rol que ejercen FoxO1, 3 y 4 sobre el metabolismo esquelético ha sido recientemente revelado gracias al uso de ratones transgénicos. La acción de los FoxOs en la homeostasis esquelética es indispensable ya que ratones carentes del gen que codifica para FoxO 1, 3 y 4 evidencian un aumento del estrés oxidativo y apoptosis de osteoblastos (42). Por otra parte, existen evidencias de que los FoxOs suprimen la proliferación y supervivencia de células endoteliales por lo cual restringen la angiogénesis, y con ello la llegada de progenitores celulares al sitio de remodelamiento óseo. Estos mecanismos estarían implicados en la supresión que se produce en la formación ósea por efecto del envejecimiento o por el exceso de glucocorticoides, ya que ambas situaciones aumentan la actividad de FoxOs (17). Se ha demostrado que los FoxOs ejercen funciones redundantes ya que se unen a una misma se-

teína de baja densidad 5 o 6 (LRP5 o 6), presentes en la membrana del osteoblasto, favoreciendo su proliferación, diferenciación y actividad y, en consecuencia, la formación ósea (35-39) (Fig. 4).

El estrés oxidativo está involucrado en los procesos de formación y resorción a través del efecto que ejercen las ERO sobre los osteoblastos y osteoclastos (40). En este sentido, las ERO activan distintas vías y desarrollan un amplio espectro de respuestas que, dependiendo del tipo de célula ósea, puede desencadenar su proliferación y crecimiento, el arresto de su ciclo celular y por lo tanto su diferenciación, o su apoptosis (41).

El rol que ejercen FoxO1, 3 y 4 sobre el metabolismo esquelético ha sido recientemente revelado gracias al uso de ratones transgénicos. La acción de los FoxOs en la homeostasis esquelética es indispensable ya que ratones carentes del gen que codifica para FoxO 1, 3 y 4 evidencian un aumento del estrés oxidativo y apoptosis de osteoblastos (42). Por otra parte, existen evidencias de que los FoxOs suprimen la proliferación y supervivencia de células endoteliales por lo cual restringen la angiogénesis, y con ello la llegada de progenitores celulares al sitio de remodelamiento óseo. Estos mecanismos estarían implicados en la supresión que se produce en la formación ósea por efecto del envejecimiento o por el exceso de glucocorticoides, ya que ambas situaciones aumentan la actividad de FoxOs (17). Se ha demostrado que los FoxOs ejercen funciones redundantes ya que se unen a una misma se-

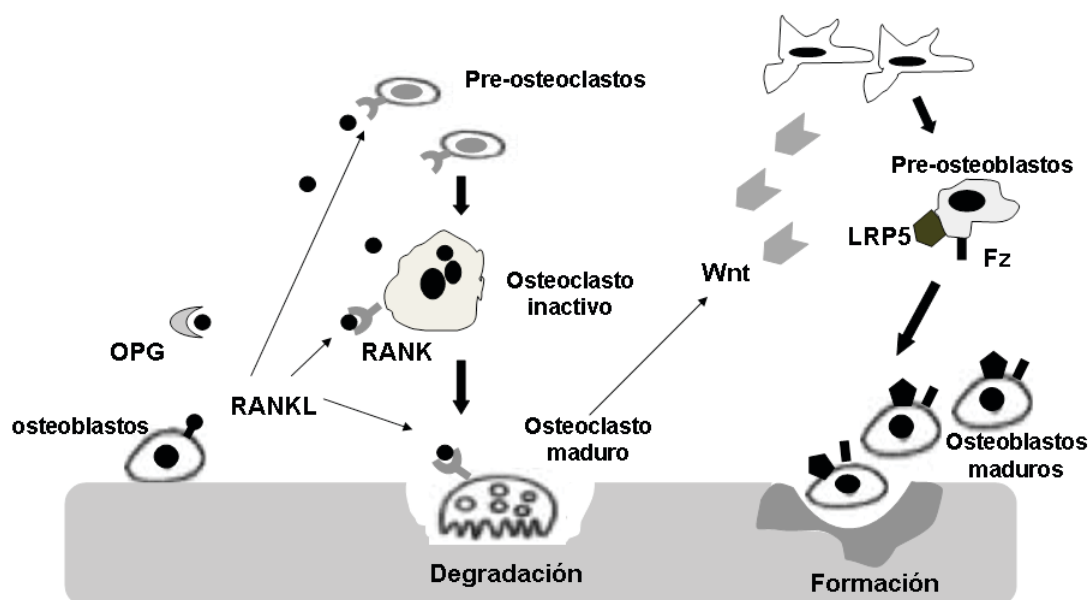


Figura 4. Citoquinas involucradas en la actividad de las células óseas.

cuencia en el ADN, regulan genes comunes y se comportan bioquímicamente en forma similar (43). FoxO1 es indispensable durante el desarrollo ya que ratones carentes del gen que codifica para FoxO1 (*knock-out*) mueren durante la embriogénesis por un defecto en la angiogénesis (44). FoxO3 es esencial para mantener el *pool* de células hematopoyéticas y al igual que FoxO1, participa en el metabolismo de la glucosa (17) (45).

La expresión de FoxO1, 3 y 4 en hueso y células óseas ejerce efectos autónomos sobre osteoblastos y osteoclastos que incluyen la activación de los mecanismos de defensa de ambas células o la modulación en la actividad de la señal Wnt/ β -catenina en el osteoblasto o RANK/RANKL/OPG/NF- κ B en el osteoclasto (46).

EFFECTO DE FoxO SOBRE OSTEÓBLASTOS

En respuesta a las ERO todas las células osteogénicas, a través de FoxOs, pueden regular la actividad de enzimas antioxidantes y activar genes como Gadd45 para reparar ADN y así protegerse del estrés oxidativo; sin embargo, la acción de las ERO dependerá del tipo de célula y del estadio de diferenciación celular. En base a ello se diferencia la acción que ejercen las ERO sobre osteoblastos maduros de aquella que ocurre sobre progenitores osteoblásticos y sobre precursores mesenquimales.

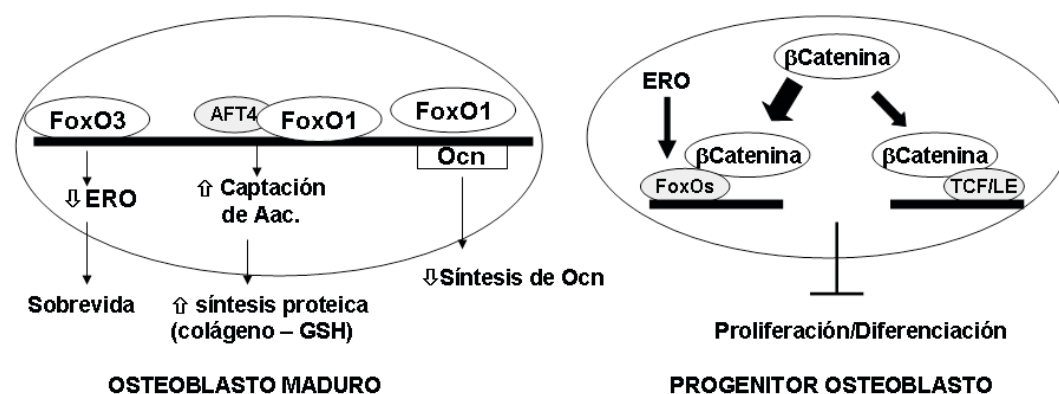
OSTEÓBLASTOS MADUROS

Las ERO generadas dentro de las mitocondrias activan quinasas que fosforilan a la proteína de señalización p66^{shc}. Esta proteína fosforilada convierte la señal oxidativa en apoptosis regulando factores proapoptóticos como Bcl2 y ligando de Fas pero, a su vez, presenta

capacidad para generar ERO en la mitocondria y con ello amplificar la producción de H₂O₂ (47). Mediante este mecanismo se incrementa el estrés oxidativo y se induce la apoptosis de varios tipos celulares incluyendo a los osteoblastos maduros.

FoxO3 reduce el estrés oxidativo y promueve la supervivencia del osteoblasto ya que, bajo el promotor de osteocalcina, disminuye la fosforilación de p66^{shc}, lo que aumenta el número y disminuye la apoptosis de osteoblastos y osteocitos. FoxO1 ejerce el mismo efecto que FoxO3 a excepción de que no afecta la apoptosis del osteoblasto (48). La acción que ejercen los FoxOs sobre osteoblastos maduros sugiere que estos mediadores son críticos para la defensa oxidante, contribuyendo a la homeostasis esquelética. Por ello, la edad y la deficiencia estrogénica conducen a un incremento del daño oxidativo aumentando la apoptosis osteoblástica y osteocítica.

El factor de transcripción activante 4 (ATF4) cumple dos funciones importantes en osteoblastos maduros. Por un lado regula la expresión de osteocalcina y de RANKL y, por el otro, promueve la captación de aminoácidos asegurando el proceso de síntesis proteica en el osteoblasto. FoxO1 se une a ATF4, hecho que potencia ambas actividades transcripcionales favoreciendo la síntesis de glutatión y colágeno tipo I; al mismo tiempo, FoxO1 se une al promotor de osteocalcina, lo cual disminuye su producción y con ello la fosforilación de p66^{shc} (49). Este mecanismo es además importante porque se ha determinado recientemente que el osteoblasto actuando como "célula endócrina" controla el metabolismo de la glucosa y el energético a través de la secreción de osteocalcina (Fig. 5).



Modificado de Almeida M. Ref. 27

Figura 5. Efecto de las ERO y FoxOs sobre osteoblastos.

La osteocalcina es una pequeña proteína sintetizada exclusivamente por el osteoblasto en forma vitamínica K dependiente. Esa proteína contiene tres residuos de ácido glutámico, los cuales se carboxilan por acción de la vitamina D; la osteocalcina carboxilada se libera a circulación y rápidamente es captada por el Ca de la hidroxiapatita permaneciendo depositada en hueso (34). Hasta hace unos años no se conocía exactamente cuál era la función de dicha proteína; en la actualidad se ha demostrado que la osteocalcina se decarboxila durante el proceso de resorción gracias a la disminución marcada del pH que genera el osteoclasto en la laguna de resorción. La osteocalcina no carboxilada es una hormona que, actuando sobre el páncreas, promueve la proliferación de las células β, la secreción y la sensibilidad a la insulina, y el gasto energético (50).

La bioactividad de la osteocalcina está regulada negativamente por la proteína tirosina fosfatasa (OST-PTP), producto del gen Esp, que se expresa en osteoblastos. El osteoblasto contiene un RIn del tipo quinasa. La OST-PTP inactiva al RIn por desfosforilación; este mecanismo desencadena señales intracelulares que estimulan la síntesis de OPG y reducen la de RANKL y con ello la actividad resorptiva. FoxO1 incrementa la producción del gen Esp y con ello disminuye la bioactividad de la osteocalcina induciendo una disminución en la proliferación de las células β del páncreas y en la secreción y sensibilidad a la insulina (49). Inversamente, la insulina actuando sobre su receptor activa la señal PI3/AKT con lo cual se fosforila y degrada FoxO1 promoviendo la bioactividad de osteocalcina y controlando la homeostasis de la glucosa (51).

La presencia de FoxO1 en las células pancreáticas regula el metabolismo de los lípidos y de la glucosa. En respuesta al estrés oxidativo producto de hiperglucemia, el FoxO1 presente en las células β del páncreas activa la expresión de genes que la protegen de dicha situación, preservando la secreción de insulina y pro-

moviendo la sobrevida celular (52-53).

En osteoblastos maduros la proteína Sirt1 presenta una acción similar a FoxOs induciendo efectos positivos sobre la masa ósea (54). Un aumento de ERO induce un incremento en Sirt1 debido a una elevada concentración de NAD⁺ con lo cual se estimula la defensa antioxidante aumentando la producción de MnSOD y CAT (52).

PROGENITORES OSTEOBLÁSTICOS

La β-catenina es un coactivador transcripcional que presenta un rol fundamental en la diferenciación de progenitores pluripotenciales mesenquimáticos (células madre mesenquimáticas o MSCs) hacia el linaje osteoblástico (55) (56). En este sentido, cabe recordar que las MSCs que se localizan en médula ósea, músculo y grasa, de acuerdo a la activación de distintos factores de transcripción, pueden diferenciarse hacia una variedad de tejidos incluyendo hueso, cartílago, músculo y grasa.

La vía canónica de señalización Wnt/β-catenina es un determinante crítico de la masa ósea, ya que aumenta el número y previene la apoptosis de progenitores osteoblásticos (3) (57). La unión de Wnt/fz/LRP5 o 6 inactiva a la glucógeno sintetasa-quinasa 3β (GSK-3β) evitando la degradación proteasomal de β-catenina, que se acumula en el citoplasma y puede trasladarse al núcleo. A nivel nuclear se asocia a la familia de factores de transcripción de células T/potenciador de unión linfóide (TCF/LE) regulando la expresión de varios genes implicados en la diferenciación celular (58-60) (Fig. 5). Al mismo tiempo que estimula la producción de varios marcadores osteoblásticos como Runx2 (*core-binding factor 1*: Cbfa1), osterix, colágeno tipo I, fosfatasa alcalina óseo-específica (FAO) y unidades de formación de colonias osteoprogenitoras (CFU-O), suprime la actividad de PPARγ y con ello la diferenciación de preadipocitos (17). Por otra parte, la activación de β-catenina en osteoblastos estimula la producción de OPG, potente

inhibidor de la diferenciación osteoclástica, con lo cual se induce la disminución de la osteoclastogénesis y de la resorción ósea (61) (62). Por lo tanto, la vía Wnt/ β -catenina aumenta la masa ósea estimulando la osteoblastogénesis y suprimiendo la apoptosis osteoblástica pero también reduciendo la adipogénesis y la osteoclastogénesis (3) (63) (64).

La señal Wnt/ β -catenina participa también del mecanismo por el cual la parathormona (PTH) regula la actividad osteoblástica. La unión de PTH a su receptor PTH1R induce la asociación entre el correceptor LRP6 y el PTHRI, mecanismo por el cual se estabiliza la β -catenina y, consecuentemente, permite su transcripción que, mediante su unión a TCF/LE, favorece la osteoblastogénesis y el incremento en la formación ósea (11).

Se conocen varios antagonistas de la vía canónica de señalización Wnt. Los factores solubles Dickkopf (Dkks) liberados por osteoclastos y la esclerostina (Sost) secretada por los osteocitos se unen a los receptores de Wnt o se interponen entre ellos activando la fosforilación de la β -catenina y su degradación proteosomal (3) (11) (65-67).

Las ERO intracelulares regulan negativamente la vía de las Wnt. En varias células, incluidos los osteoblastos, el H_2O_2 promueve la transcripción de FoxO, favoreciendo su asociación con β -catenina en el núcleo. Este mecanismo, debido a una competencia entre FoxOs y TCF por un *pool* limitado de β -catenina, compromete la transcripción mediada por β -catenina/TCF y con ello la diferenciación osteoblástica (68). Se sugiere que dicha interacción evitaría la proliferación osteoblástica en condiciones patológicas de estrés oxidativo y explicaría cómo durante el envejecimiento el aumento del estrés oxidativo lleva a un déficit en el número de osteoblastos. Por otra parte, la activación de FoxOs también permite evitar indirectamente la osteoblastogénesis activando genes implicados en la producción de inhibidores de la señal Wnt como son los factores de transcripción solubles de receptor frizzled 1 y 2 (FRP1, y sFRP2) (69).

Por otra parte, un efecto importante que resulta de la interacción β -catenina/TCF es la supresión de la actividad de PPAR γ ; cuando los ERO interfieren en dicha interacción, no sólo inducen una disminución en la expresión de los distintos marcadores de linaje osteoblástico sino que, además, incrementan los niveles PPAR γ . El resultado final es una disminución en la diferenciación osteoblástica, un incremento en la apoptosis de osteoblastos y un aumento de la lipogénesis.

EFFECTO SOBRE CÉLULAS MESENQUIMALES Y OSTEOGÉNESIS

Los precursores osteoblásticos tempranos también están sometidos a la acción de las ERO. El efecto de

los mismos sobre la proliferación osteoblástica estaría dado por su habilidad para activar una cascada de señales a través del factor proteico p53, el cual se encuentra específicamente ligado al arresto del ciclo celular (70). FoxO1, mediante su unión a AFT4, reprime la señalización por p53 y con ello mantiene la proliferación normal y la homeostasis ósea asegurando el aporte de aminoácidos y la síntesis proteica. Por otra parte, a diferencia de lo que ocurre en osteoblastos maduros, FoxO1 aumenta la producción de osteocalcina y FAO; este efecto es mediado por la inducción cooperativa de genes implicados en la diferenciación osteoblástica que surge de la unión de FoxO1 a Runx2 (49). Por otra parte, al inhibir la actividad del promotor de PPAR γ , los FoxOs antagonizan la transcripción de dicho factor en preadipocitos, lo que favorece la adipogénesis a expensas de la osteogénesis (71). Por ello, los FoxOs controlan la generación de nuevos osteoblastos a partir de MSCs modulando tanto la proliferación y/o diferenciación a través de sus propiedades antioxidantes como la actividad de otros factores transcripcionales como β -catenina y PPAR γ .

EFFECTO SOBRE LOS OSTEOCLASTOS

Los osteoclastos activos son células móviles multinucleares que presentan alta demanda energética y contienen una gran cantidad de mitocondrias. A través de la generación de H_2O_2 , estas organelas juegan un rol importante en la proliferación, diferenciación y función del osteoclasto. Las ERO aumentan el número y la actividad de los osteoclastos aumentando la producción del factor de necrosis tumoral α (TNF α), citoquina proinflamatoria que no sólo causa daño celular sino que también inhibe a la SOD y con ello disminuye las defensas antioxidantes; asimismo, TNF α actuando sobre receptores presentes en la membrana del osteoblasto estimula la producción de RANKL y con ello la resorción ósea (17) (72).

La unión de RANKL a RANK desencadena múltiples señales intracelulares mediante la unión a receptores de factores asociados a TNF (TRAFs). La asociación con TRAF2 activa a las JNK necesarias para la activación de pasos intracelulares que llevan a la formación del anillo de actina; la unión con TRAF6 activa al factor de transcripción NF-kB, lo que aumenta la actividad resorptiva de los osteoclastos maduros al favorecer su reclutamiento, diferenciación, actividad y sobrevivencia (73). Por otra parte, en forma de retroalimentación positiva el RANKL, a través de la vía TRAF6/Rac1/oxidasas Nox1-NADPH asociada a membrana plasmática, estimula la producción extra-mitocondrial de ERO (74). En osteoclastos, RANKL aumenta la expresión de GPx en los macrófagos de la médula ósea, mientras que los estrógenos lo hacen en osteoclastos maduros (Fig. 6).

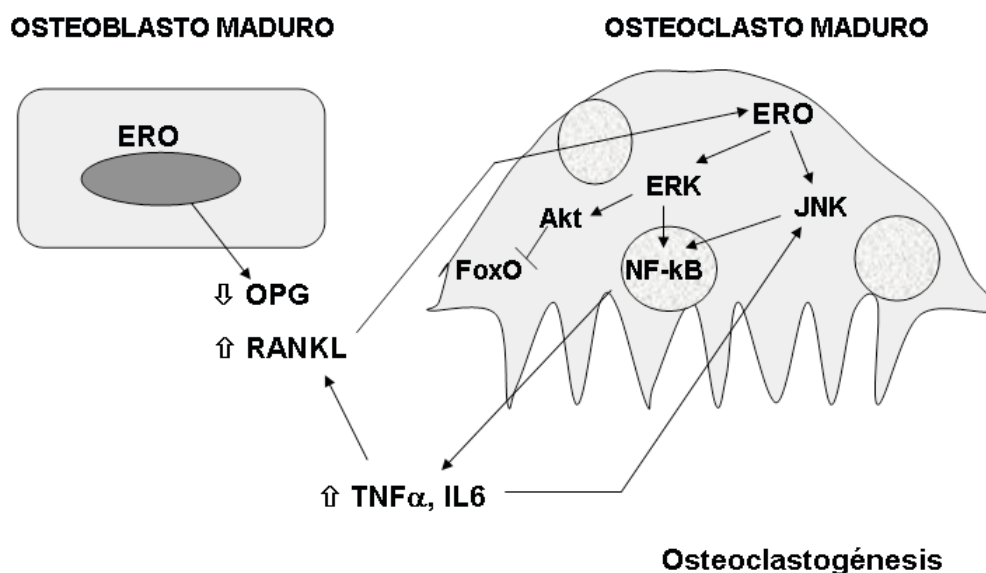


Figura 6. Efecto de las ERO y FoxOs sobre osteoclastos.

ESTRÉS OXIDATIVO Y OSTEOPOROSIS

La caída estrogénica que se produce en la mujer postmenopáusia o en la rata ovariectomizada reduce la masa ósea debido a un aumento en la velocidad de remodelamiento óseo favoreciendo el proceso de la osteoclastogénesis en forma conjunta con una disminución en la sobrevivencia de los osteoblastos (75). El efecto antiosteoporótico que ejercen los estrógenos se debe, al menos en parte, a su habilidad para proteger al hueso frente al estrés oxidativo, tanto en forma genómica como no genómica. Mediante la interacción entre el REa y el ADN, los estrógenos aumentan la actividad de receptor estrogénico (RE) y disminuyen la fosforilación de p66^{shc}, con lo cual la generación de ERO disminuye. El efecto de los estrógenos sobre el estrés oxidativo no genómico es producido por la activación de ERK citoplasmáticas (76).

Los estrógenos disminuyen la tasa de remodelamiento y mantienen un equilibrio entre los procesos de formación y resorción. Por un lado, controlan la formación ósea modificando la vía de la proteína morfogenética 2 (BMP-2), vía adicional a la de las Wnt en el proceso de diferenciación osteoblástica. Los estrógenos activan a las ERKs que al fosforilar a Smad 1 favorecen su degradación proteosomal y con ello la transcripción de la BMP-2 se atenúa. Como BMP-2 potencia el efecto de RANKL, esta atenuación disminuye la formación y sobrevivencia del osteoclasto. Los estrógenos, además, al inhibir la fosforilación de p66^{shc} reducen la activación del factor de transcripción NF-κB y, en consecuencia, la producción de interleuquina 6 (IL-6) y de TNFα, dos citoquinas proinflamatorias que estimulan la osteoclastogénesis y que son las responsables de la pérdida de hueso por deficiencia estrogénica.

La pérdida de hueso que se produce normalmente por la edad, tanto en humanos como en animales, se evidencia por un afinamiento de las trabéculas debido a una disminución en el número de osteoblastos y no en su capacidad biosintética, producto de una osteoblastogénesis disminuida o una apoptosis incrementada (11). En este sentido, con la edad se observan aumentos en la senescencia de la población de células MSCs y células osteoblásticas, en la acumulación de daños en el ADN y en la secreción del factor fenotípico secretor asociado a senescencia (SASP). Estos hechos conducen al incremento en la secreción de citoquinas proinflamatorias implicadas en la estimulación de la osteoclastogénesis (77).

La disminución en la masa ósea asociada al envejecimiento está ligada al estrés oxidativo (78); modelos murinos de envejecimiento prematuro y signos de daño oxidativo muestran características osteoporóticas. En hueso de ratones adultos, la expresión de los genes que se producen por la interacción de β-catenina y, al mismo tiempo, TCF disminuye, al mismo tiempo, aumentan aquellos correspondientes a los factores de transcripción FoxO (68)(79). De manera similar, estudios clínicos en mujeres osteoporóticas demostraron una asociación entre el aumento del estrés oxidativo tanto con los menores niveles plasmáticos de antioxidantes como con una disminución de densidad mineral ósea (DMO) (80)(81).

La consecuencia del aumento en los niveles de ERO, tanto por deficiencia esteroidea como por el envejecimiento se traduce en una menor actividad de la GSR en médula ósea con el consiguiente incremento en la fosforilación de p53 y p66^{shc} (81). Este proceso favorece la fosforilación de FoxO, vía Akt, y su degradación. Por otro lado,

las ERO estimulan al factor de transcripción NF- κ B con lo cual se inhibe a las quinasas I κ B que fosforilan y activan a FoxO3 con lo cual, al menos en parte, permiten su ubiquitinación y consiguiente degradación (78) (82-84).

El estrés oxidativo promueve el desarrollo de osteoporosis estimulando además la peroxidación lipídica, mecanismo por el cual se inhibe a la vía de señalización Wnt y con ello se induce una disminución en el número de osteoblastos y, por ende, en la formación ósea (85). En este sentido, la pérdida de masa ósea con la edad se encuentra asociada al aumento en la expresión de lipoxigenasas; estas enzimas producen HO \cdot que oxidan a los PUFAs generando moléculas prooxidantes como el 4-hidroxinanonol (4-HNE) (86). El incremento de la oxidación lipídica y de la producción de 4-HNE, al igual que de H $_2$ O $_2$, activa a los FoxOs atenuando la transcripción mediada por β -catenina/TCF (87). Este mecanismo incrementa los niveles de PPAR γ que al asociarse con la β -catenina aumenta su degradación. La disminución en el *pool* de β -catenina desencadena a su vez un aumento en la expresión de PPAR γ y con ello un incremento en la adipogénesis a expensas de la osteoblastogénesis (88). Este mecanismo explicaría el aumento de adipocitos que se observa en la médula ósea tanto de humanos como de ratones con osteoporosis evolutiva (86) (Fig. 7). Finalmente, el 4-HNE no es sólo responsable de osteoporosis ya que se ha demostrado que se encuentra aumentado en pacientes con enfermedad de Alzheimer (89) (90).

Conclusiones

Una serie de estudios recientes ha determinado la importancia fisiológica de las ERO sobre el remodelamiento óseo a través de su acción sobre las distintas células óseas. Las ERO desencadenan mecanismos de control homeostáticos indispensables para la salud ósea. El mecanismo más importante es la activación de los FoxOs, tendiente a evitar el estrés oxidativo y con ello el daño celular. La función de los FoxOs es ejercida mediante la regulación en la actividad de enzimas antioxidantes, de enzimas que reparan el ADN o de distintos genes involucrados en el ciclo celular, según el tipo de célula y su grado de diferenciación. Los FoxOs estimulan la producción de factores vitales para el osteoblasto como Runx2, AFT4 y β -catenina. Mediante dichas acciones FoxOs promueven la osteoblastogénesis o mantienen el *pool* de progenitores mesenquimales tempranos, regulan la proliferación/diferenciación de precursores osteoblásticos y protegen al osteoblasto maduro del estrés oxidativo. Además los FoxOs atenúan, por acciones directas o indirectas, la osteoclastogénesis.

Con la edad, el aumento del estrés oxidativo disminuye el número de osteoblastos debido a una competencia entre FoxOs y TCF/LE por un *pool* limitado de β -catenina. Este efecto produce a la vez un aumento en la actividad de los PPAR γ , con lo cual se acelera la adipogénesis a expensas de la osteoblastogénesis y al mismo tiempo la oxidación de los PUFAs. Este hecho

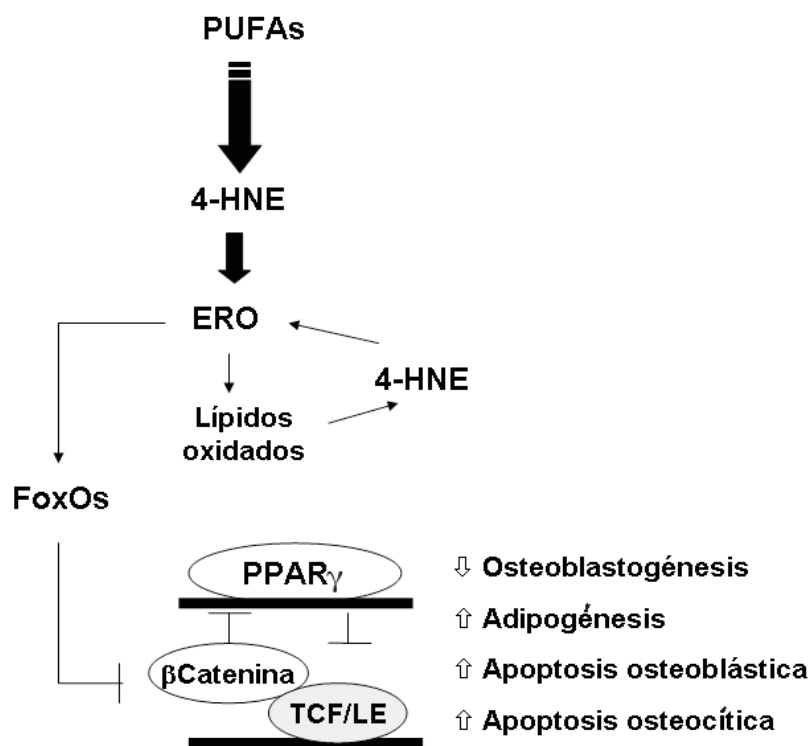


Figura 7. Oxidación de ácidos grasos poliinsaturados y estrés oxidativo.

genera una serie de compuestos pro-oxidantes como el 4-HNE que aumentan el estrés oxidativo. Asimismo, la caída estrogénica acelera la osteoclastogénesis por vía genómica o no genómica, aumentando la fosforilación de la proteína p66^{shc} o activando al factor NF-κB.

Dada la importancia de FoxOs y ERO en la biología ósea y durante el envejecimiento, clarificar los eventos celulares y pasos moleculares involucrados en el control del estrés oxidativo sería vital para entender la regulación de la osteoporosis relacionada a la edad.

CORRESPONDENCIA

DRA. SUSANA N. ZENI
Córdoba 2351-8vo. Piso (1120)
BUENOS AIRES, Argentina
Tel-FAX: 541159508972
E-mail: snzeni@hotmail.com

Referencias bibliográficas

1. Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med* 2006; 36: 327-58.
2. Filaire E, Toumi H. Reactive oxygen species and exercise on bone metabolism: Friend or enemy? *Joint Bone Spine* 2012; 79: 341-6.
3. Kirkwood TB. Understanding the odd science of aging. *Cell* 2005; 120: 437-47.
4. Storz P. Mitochondrial ROS-radical detoxification, mediated by protein kinase D. *Trends Cell Biol* 2007; 17: 13-8.
5. Storz P. Forkhead homeobox type O transcription factors in the responses to oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2011; 14: 593-605.
6. Bogeski I, Kappl R, Kummerow C, Gulaboski R, Hoth M, Niemeyer BA. Redox regulation of calcium ion channels: Chemical and physiological aspects. *Cell Calcium* 2011; 50: 407-23.
7. Coffey MJ, Coles B, O'Donnell VB. Interactions of nitric oxide-derived reactive nitrogen species with peroxidases and lipoxygenases. *Free Radic Res* 2001; 35: 447-64.
8. Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 1996; 273: 59-63.
9. Wanagat J, Dai DF, Rabinovitch P. Mitochondrial oxidative stress and mammalian healthspan. *Mech Ageing Dev* 2010; 131: 527-35.
10. Avello M, Suwalsky M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)* 2006; 494: 161-72.
11. Sontakke AN, Tare RS. A duality in the roles of reactive oxygen species with respect to bone metabolism. *Clin Chim Acta* 2002; 318: 145-8.
12. Barja G. Free radicals and aging. *Trends Neurosci* 2004; 27: 595-600.
13. Harman D. Free radical theory of aging: role of free radical reactions in the origination and evolution of life, aging and disease processes. *Mod Trends Aging Res* 1986; 147: 77-83.
14. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956; 11: 298-300.
15. Sena LA, Chandel NS. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell* 2012; 48: 158-67.
16. Greer EL, Brunet A. FoxO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* 2005; 24: 7410-25.
17. Manolagas SC. From estrogen-centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. *Endocrine Reviews* 2010; 31: 266-300.
18. Russell SJ, Kahn CR. Endocrine regulation of ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 681-91.
19. van der Horst A, Burgering BM. Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 440-50.
20. Calnan DR, Brunet A. The FoxO code. *Oncogene* 2008; 27: 2276-88.
21. Essers MAG, Weijzen S, de Vries-Smits AMM, Saarloos I, de Ruiter ND, Bos JL, *et al.* FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. *EMBO J* 2004; 23: 4802-12.
22. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, *et al.* Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 1999; 96: 857-68.
23. Kops GJPL, de Ruiter ND, De Vries-Smits AMM, Powell DR, Bos JL, Burgering BMT. Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature* 1999; 398: 630-4.
24. Biggs WH 3rd, Meisenhelder J, Hunter T, Cavenee WK, Arden KC. Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 7421-6.
25. Tang ED, Nuñez G, Barr FG, Guan KL. Negative regulation of the forkhead transcription factor FKHR by Akt. *J Biol Chem* 1999; 274: 16741-6.
26. Takaishi H, Konishi H, Matsuzaki H, Ono Y, Shirai Y, Saito N, *et al.* Regulation of nuclear translocation of forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 11836-41.
27. Almeida M. Unraveling the role of FoxOs in bone - insights from mouse models. *Bone* 2011; 49: 319-27.
28. Eijkelenboom A, Burgering BM. FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; 14: 83-97.
29. Lee YH, Giraud J, Davis RJ, White MF. c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *J Biol Chem* 2003; 278: 2896-902.
30. Salih DA, Brunet A. FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging. *Curr Opin Cell Biol* 2008; 20: 126-36.
31. Dijkers PF, Medema RH, Lammers JWJ, Koenderman L, Coffey PJ. Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr Biol* 2000; 10: 1201-4.
32. Ma Q, Fu W, Li P, Nicosia SV, Jenster G, Zhang X, *et al.* FoxO1 mediates PTEN suppression of androgen receptor

- N- and C-terminal interactions and coactivator recruitment. *Mol Endocrinol* 2009; 23: 213–25.
33. Schuur ER, Loktev AV, Sharma M, Sun Z, Roth RA, Weigel RJ. Ligand-dependent interaction of estrogen receptor- α with members of the forkhead transcription factor family. *J Biol Chem* 2001; 276: 33554–60.
 34. Reynaga Montecinos B, Zeni SN. Marcadores bioquímicos del remodelamiento óseo: Utilidad Clínica. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2009; 43: 177-93.
 35. Moon RT, Bowerman B, Boutros M, Perrimon N. The promise and perils of Wnt signaling through β -catenin. *Science* 2002; 296: 1644-6.
 36. Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, *et al.* Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 2003; 423: 448-52.
 37. Nusse R. Wnts and hedgehogs: lipid-modified proteins and similarities in signaling mechanisms at the cell surface. *Development* 2003; 130: 5297–305.
 38. Tamai K, Semenov M, Kato Y, Spokony R, Liu C, Katayama Y, *et al.* LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 2000; 407: 530-5.
 39. He X, Semenov M, Tamai K, Zeng X. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/ β -catenin signaling: arrows point the way. *Development* 2004; 131: 1663-77.
 40. Altindag O, Erel O, Soran N, Celik H, Selek S. Total oxidative/anti-oxidative status and relation to bone mineral density in osteoporosis. *Rheumatol Int* 2008; 28: 317–21.
 41. Bai XC, Lu D, Liu AL, Zhang ZM, Li XM, Zou ZP, *et al.* Reactive oxygen species stimulates receptor activator of NF- κ B ligand expression in osteoblast. *J Biol Chem* 2005; 280: 17497–506.
 42. Ambrogini E, Almeida M, Martin-Millan M, Paik JH, Depinho RA, Han L, *et al.* FoxO-mediated defense against oxidative stress in osteoblasts is indispensable for skeletal homeostasis in mice. *Cell Metab* 2010; 11: 136-46.
 43. Obsil T, Obsilova V. Structure/function relationships underlying regulation of FOXO transcription factors. *Oncogene* 2008; 27: 2263–75.
 44. Furuyama T, Kitayama K, Shimoda Y, Ogawa M, Sone K, Yoshida-Araki K, *et al.* Abnormal angiogenesis in Foxo1 (Fkhr)-deficient mice. *J Biol Chem* 2004; 279: 34741–9.
 45. Kousteni S. FoxO1, the transcriptional chief of staff of energy metabolism. *Bone* 2012; 50: 437-43
 46. Kousteni S. FoxOs: Unifying links between oxidative stress and skeletal homeostasis. *Curr Osteoporos Rep* 2011; 9: 60-6.
 47. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* 2012; 24: 981-90.
 48. Almeida M, Han L, Ambrogini E, Bartell SM, Manolagas SC. Oxidative stress stimulates apoptosis and activates NF- κ B in osteoblastic cells via a PKC β /p66^{shc} signaling cascade: counter regulation by estrogens or androgens. *Mol Endocrinol* 2010; 24: 2030–7.
 49. Rached MT, Kode A, Silva BC, Jung DY, Gray S, Ong H, *et al.* FoxO1 expression in osteoblasts regulates glucose homeostasis through regulation of osteocalcin in mice. *J Clin Invest* 2010; 120: 357–68.
 50. Clemens TL, Karsenty G. The osteoblast: an insulin target cell controlling glucose homeostasis. *J Bone Miner Res* 2011; 26: 677-80.
 51. Karsenty G, Ferron M. The contribution of bone to whole-organism physiology. *Nature* 2012; 481: 314-20.
 52. Kitamura YI, Kitamura T, Kruse JP, Raum JC, Stein R, Gu W, *et al.* FoxO1 protects against pancreatic beta cell failure through NeuroD and MafA induction. *Cell Metab* 2005; 2: 153–63.
 53. Buteau J, Accili D. Regulation of pancreatic β -cell function by the forkhead protein FoxO1. *Diabetes Obes Metab* 2007; 9 (Suppl 2): 140-6.
 54. Edwards JR, Zainabadi K, Lwin ST, Elefteriou F, Munoz S, Moore MM, Guarente L, Mundy GR. The longevity gene SIRT1 independently controls both osteoblast and osteoclast function. *J Bone Miner Res* 2008; 23: S28.
 55. Kolpakova E, Olsen BR. Wnt/ β -catenin - a canonical tale of cell-fate choice in the vertebrate skeleton. *Dev Cell* 2005; 8: 626-7.
 56. Hartmann C. A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis. *Trends Cell Biol* 2006; 16: 151-8.
 57. Marcellini S, Henriquez JP, Bertin A. Control of osteogenesis by the canonical Wnt and BMP pathways *in vivo*: cooperation and antagonism between the canonical Wnt and BMP pathways as cells differentiate from osteochondroprogenitors to osteoblasts and osteocytes. *Bioessays* 2012; 34: 953-62.
 58. Ruel L, Stambolic V, Ali A, Manoukian AS, Woodgett JR. Regulation of the protein kinase activity of Shaggy (Zeste-white3) by components of the wingless pathway in *Drosophila* cells and embryos. *J Biol Chem* 1999; 274: 21790-6.
 59. Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, *et al.* Control of β -catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 2002; 108: 837–47.
 60. Bienz M, Clevers H. Armadillo/ β -catenin signals in the nucleus - proof beyond a reasonable doubt? *Nat Cell Biol* 2003; 5: 179-82.
 61. Glass DA 2nd, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, *et al.* Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell* 2005; 8: 751-64.
 62. Holmen SL, Zylstra CR, Mukherjee A, Sigler RE, Faugere MC, Bouxsein ML, *et al.* Essential role of β -catenin in post-natal bone acquisition. *J Biol Chem* 2005; 280: 21162-8.
 63. Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 885–96.
 64. Song L, Liu M, Ono N, Bringhurst FR, Kronenberg HM, Guo J. Loss of wnt/ β -catenin signaling causes cell fate shift of preosteoblasts from osteoblasts to adipocytes. *J Bone Miner Res* 2012; 27: 2344-58.
 65. Niehrs C. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene* 2006; 25: 7469–81.
 66. Li X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, Zhang J, *et al.* Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem* 2005; 280: 19883-7.

67. Canalis E, Giustina A, Bilezikian JP. Mechanisms of anabolic therapies for osteoporosis. *N Engl J Med* 2007; 357: 905-16.
68. Almeida M, Han L, Martin-Millan M, O'Brien CA, Manolagas SC. Oxidative stress antagonizes Wnt signaling in osteoblast precursors by diverting beta-catenin from T cell factor- to forkhead box O-mediated transcription. *J Biol Chem* 2007; 282: 27298-305.
69. Paik JH, Ding Z, Narurkar R, Ramkissoon S, Muller F, Kamoun WS, *et al.* FoxOs cooperatively regulate diverse pathways governing neural stem cell homeostasis. *Cell Stem Cell* 2009; 5: 540-53.
70. Satyanarayana A, Rudolph KL. p16 and ARF: activation of teenage proteins in old age. *J Clin Invest* 2004; 114: 1237-40.
71. Armoni M, Harel C, Karni S, Chen H, Bar-Yoseph F, Ver MR, *et al.* FOXO1 represses peroxisome proliferator-activated receptor-gamma1 and -gamma2 gene promoters in primary adipocytes. A novel paradigm to increase insulin sensitivity. *J Biol Chem* 2006; 281: 19881-91.
72. Garrett IR, Boyce BF, Oreffo RO, Bonewald L, Poser J, Mundy GR. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone *in vitro* and *in vivo*. *J Clin Invest* 1990; 85: 632-9.
73. Ha H, Kwak HB, Lee SW, Jin HM, Kim HM, Kim HH, *et al.* Reactive oxygen species mediate RANK signaling in osteoclasts. *Exp Cell Res* 2004; 301: 119-27.
74. Lee NK, Choi YG, Baik JY, Han SY, Jeong DW, Bae YS, *et al.* A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. *Blood* 2005; 106: 852-9.
75. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 2000; 21: 115-37.
76. Manolagas SC, Almeida M. Gone with the Wnts: β -catenin, T-cell factor, forkhead box O, and oxidative stress in age-dependent diseases of bone, lipid, and glucose metabolism. *Mol Endocrinol* 2007; 21: 2605-14.
77. Chen Q, Liu K, Robinson AR, Clauson CL, Blair HC, Robbins PD, *et al.* DNA damage drives accelerated bone aging via an NF- κ B-dependent mechanism. *J Bone Miner Res* 2012; 28: 1214-28.
78. Almeida M. Aging mechanisms in bone. *Bonekey Rep* 2012; 1-14. 0.1038/bonekey.2012.102. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3659822/>. Fecha de acceso: 30 de julio de 2013.
79. Almeida M, Han L, Martin-Millan M, Plotkin LI, Stewart SA, Roberson PK, *et al.* Skeletal involution by age-associated oxidative stress and its acceleration by loss of sex steroids. *J Biol Chem* 2007; 282: 27285-97.
80. Basu S, Michaelsson K, Olofsson H, Johansson S, Melhus H. Association between oxidative stress and bone mineral density. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288:275-9.
81. Maggio D, Barabani M, Pierandrei M, Polidori MC, Cattani M, Mecocci P, *et al.* Marked decrease in plasma antioxidants in aged osteoporotic women: results of a cross-sectional study. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 1523-7.
82. Giorgio M, Migliaccio E, Orsini F, Paolucci D, Moroni M, Contursi C, *et al.* Electron transfer between cytochrome c and p66^{shc} generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell* 2005; 122: 221-33.
83. Hu MC, Lee DF, Xia W, Golfman LS, Ou-Yang F, Yang JY, *et al.* I κ B kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. *Cell* 2004; 117: 225-37.
84. De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G. Cross-talk between nuclear receptors and nuclear factor -B. *Oncogene* 2006; 25: 6868-86.
85. Ozgocmen S, Kaya H, Fadillioglu E, Aydogan R, Yilmaz Z. Role of antioxidant systems, lipid peroxidation, and nitric oxide in postmenopausal osteoporosis. *Mol Cell Biochem* 2007; 295: 45-52.
86. Schneider C, Porter NA, Brash AR. Routes to 4-hydroxynonenal: fundamental issues in the mechanisms of lipid peroxidation. *J Biol Chem* 2008; 283: 15539-43.
87. Almeida M, Ambrogini E, Han L, Manolagas SC, Jilka RL. Increased lipid oxidation causes oxidative stress, increased peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression, and diminished pro-osteogenic Wnt signaling in the skeleton. *J Biol Chem* 2009; 284: 27438-48.
88. Sharma C, Pradeep A, Wong L, Rana A, Rana B. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation can regulate beta-catenin levels via a proteasome-mediated and adenomatous polyposis coli-independent pathway. *J Biol Chem* 2004; 279: 35583-94.
89. Cutler RG, Kelly J, Storie K, Pedersen WA, Tammara A, Hatanpaa K, *et al.* Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 2070-5.
90. Mohsenzadegan M, Mirshafiey A. The immunopathogenic role of reactive oxygen species in Alzheimer disease. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2012; 11: 203-16.

Aceptado para su publicación el 2 de agosto de 2013