



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas -Programa de Magíster en Bioquímica y
Bioinformática

Efecto de Nicotinamida sobre la diferenciación de células C2C12 a osteoblastos



Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica y Bioinformática

FERNANDO ANDRÉS RIVAS VALDÉS
CONCEPCIÓN-CHILE
2019

Profesor Guía: Soraya Gutiérrez Gallegos
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor tutor

Dr. Soraya Gutiérrez Gallegos
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Profesor Co-tutor

Dr. Alexis Salas Burgos
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción



Dr. Erik Iván Quevedo
Facultad de Medicina
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

Dr. Sebastián Boltaña
Facultad de Ciencias Naturales y
Oceanográficas
Universidad de Concepción

Dra. Violeta Morin Muñoz
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Director de Programa

Dra. Amparo Uribe
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis de Magíster fue financiada por el proyecto FONDECYT 1130697.

Agradezco a la Universidad de Concepción por la adjudicación de la beca de exención de arancel de la Dirección de Postgrado de la Universidad de Concepción, sin esta no hubiera sido posible realizar los estudios de posgrado.

Agradezco también a mis tutores, a mis compañeros de laboratorio, y a mi familia por el apoyo entregado durante la realización de mi tesis.



ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN.....	1
HIPOTESIS.....	13
OBJETIVOS.....	13
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
RESULTADOS.....	36
DISCUSIÓN.....	61
BIBLIOGRAFÍA.....	68



TABLA DE CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS	vii
INDICE DE TABLAS	viii
ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Osteoblastos en la formación del sistema esquelético.....	1
1.2 Vía de señalización en la diferenciación osteoblástica.....	1
1.3 Patologías asociadas a alteraciones de la vía osteogénica.....	3
1.4 Fibrodisplasia Osificante Progresiva.....	6
1.5 FOP y el Sistema Inmune.....	7
1.6 Tratamientos preventivos en HO.....	7
1.7 Terapias utilizadas para el tratamiento de FOP.....	8
1.8 Utilización de Nicotinamida en pacientes con FOP.....	9
1.9 Nicotinamida en la diferenciación osteoblástica.....	10
1.10 Transcriptoma y tecnología de secuenciación RNA-Seq.....	11
1.11 Modelo de estudio.....	12
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO	14
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1 Cultivo celular.....	16
3.2 Extracción de ARN.....	17
3.3 Cuantificación y determinación de Integridad del ARN.....	17
3.4 Síntesis de ADN copia.....	18
3.5 PCR en tiempo real.....	19
3.6 Identificación de osteoblastos por tinción.....	20
3.7 Ensayo de cuantificación de la actividad de Fosfatasa alcalina.....	21
3.8 Extracción de proteínas totales.....	21
3.9 Inmunodetección por Western Blot.....	22
3.10 Ensayo de Inmunocitoquímica.....	24
3.11 Análisis densitométrico y estadístico.....	25
3.12 Preparación de la biblioteca de cDNA y secuenciación RNA-Seq.....	25
3.13 Análisis Bioinformático.....	25
3.14 Validación por qPCR.....	35
4. RESULTADOS	37
4.1 Determinación del efecto de Nicotinamida sobre la osteoblastogénesis in vitro.....	37
4.2 Efecto de Nicotinamida sobre expresión de genes en células sometidas a diferenciación osteoblástica.....	39
4.3 Efecto de Nicotinamida sobre la fosforilación del complejo Smad 1/5/8 en células sometidas a diferenciación osteoblastogénica.....	41
4.4 Perfil de expresión génica mediante análisis transcriptómico.....	44
4.5 Visualización y Preprocesamiento de lecturas.....	46
4.6 Mapeo de lecturas contra genoma de referencia de Mus musculus.....	49
4.7 Análisis de expresión diferencial.....	49
4.8 Análisis de expresión diferencial mediante gráfico tipo HeatMap.....	54
4.9 Ontología génica y análisis de rutas moleculares enriquecidas.....	54

DISCUSIÓN..... 62
BIBLIOGRAFÍA.....69



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Potencial de diferenciación de células mesenquimales.....	2
Figura 2: Vía de señalización intracelular dependiente de Smad activada por BMP.....	3
Figura 3: Desarrollo de Osificación heterotópica post-trauma.....	4
Figura 4: Patologías asociadas a alteraciones en las vías de señalización involucradas en la formación ósea.....	5
Figura 5: Metabolismo intracelular de Nicotinamida.....	10
Figura 6: Diseño experimental de los tratamientos.....	16
Figura 7: Flujo de trabajo en el análisis transcriptómico.....	36
Figura 8: Nicotinamida inhibe la osteoblastogénesis <i>in vitro</i> de células C2C12...	38
Figura 9: La expresión de los genes ACVR1 y RUNX2 es independiente del tratamiento con nicotinamida	40
Figura 10: Nicotinamida inhibe la vía de señalización mediada por BMP-2.....	42
Figura 11: Nicotinamida inhibe la señal de fosforilación del complejo Smad1/5/8.	43
Figura 12: Evaluación de integridad de muestras de ARN.....	45
Figura 13: Reporte de calidad de muestras de ARN mediante RNA ScreenTape número RIN.....	45
Figura 14: Visualización de calidad de secuencias crudas.....	47
Figura 15: Cuadro resumen de módulos de importancia y calidad de lecturas crudas pre y post procesamiento.....	48
Figura 16: RseQC plot para uniformidad de cobertura a lo largo de los transcritos.....	50
Figura 17: Normalización de la data	51
Figura 18: Expresión génica diferencial entre distintas condiciones en estudio...	53
Figura 19: Análisis de clúster y de componentes principales.....	55
Figura 20: Visualización de perfil de expresión génica a través de Heatmap.....	56
Figura 21: Procesos Biológicos representados.....	59
Figura 22: Análisis de rutas moleculares enriquecidas.....	61
Figura 23: Modelo de acción propuesto para el efecto inhibitorio de Nicotinamida sobre la fosforilación del complejo Smad 1/5/8.....	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Lista de secuencia de partidores utilizados para la PCR en tiempo real.....	19
Tabla 2: Perfil térmico de los ciclos de PCR en tiempo real.....	19
Tabla 3: Genes y transcritos expresados de forma diferencial, detectados con cuffdiff.....	50
Tabla 4: Resumen del análisis de expresión diferencial por Cuffdiff.....	51
Tabla 5: Genes diferencialmente expresados entre condición BMP-2 vs NicoA+BMP-2.....	57



ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

AINES: Anti inflamatorios no esteroideos

ARN: ácido ribonucleico

ARNr: ácido ribonucleico ribosómico

ARNt: ARN de transferencia

ASCII: American Standard Code for Information Interchange

BAM: Binary Alignment Map

BED: Browser Extensible Data

BMP: Proteína Morfogénica del Hueso

cDNA: Acido desoxirribonucleico copia, a partir de un mRNA

dNTPs: Desoxi-ribonucleótidos

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

FASTA Quality Data **FOP:** Fibrodisplasia Osificante Progresiva

FPKM : Fragments per Kilobase of exón per Million reads Mapped

FR : Forward and Reverse

Frg : fragment

G : guanina

Gb : gigabases (mil millones de bases)

GC : guanina-citosina

GFF : General Feature Format

GO : Gene Ontology (Ontología de genes)

GTF : Gene Transfer Format

HO : Heterotopic Ossification

IGV : Integrative Genomics Viewer

Kb : Kilobases (1.000 bases)

KEEG : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

NAD⁺ : Nicotinamide adenine dinucleotide

NAMPT : Nicotinamide Phosphoribosyltransferase

NGS : Next Generation Sequencing

NicoA : Nicotinamida

NMNAT-1 : NMN Adenyl Transferase

NTC : No template control

OLC: *overlap layout consensus*

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man

OS : Sistema operativo

Pb : Pares de bases

PCA : Principal Component Analysis

pNPP: p- Nitrophenyl Phosphate

pNP: p- Nitrophenol

PBS : tampón fosfato salino

PCR : reacción en cadena de la polimerasa

Rpm: Revoluciones por minuto

SAM: Sequence Aligment Map

SDS: Dodecil sulfato de sodio

sff : *Standard Flowgram Format*

SNPs : Polimorfismo de nucleótido único

T : timina



RESUMEN

Los osteoblastos forman parte importante del sistema esquelético, son los encargados de generar la matriz del tejido óseo y provienen de células mesenquimales osteoprogenitoras que responden frente a diversos factores de crecimiento. Uno de los principales factores de crecimiento es la proteína morfogénica del hueso 2 (Bone Morphogenic Protein 2, BMP-2), la cual gatilla la diferenciación de las células progenitoras a osteoblastos. La mutación de un residuo de Arginina por uno de Histidina en la posición 206 (R206H) del receptor tipo I de BMP (ACVR1) genera una activación constitutiva del receptor, lo que desemboca finalmente en la osificación de los tejidos blandos. Esta grave patología llamada Fibrodisplasia Osificante Progresiva se caracteriza por la formación progresiva de hueso en lugares extraesqueléticos. Se han realizado distintos tratamientos para combatir la enfermedad, sin embargo hasta la fecha ninguno ha resultado exitoso. Mediante un tratamiento pionero en nuestro país se ha administrado nicotinamida a pacientes que presentan esta enfermedad. Los resultados indican que se ha logrado atenuar el avance de la osificación muscular. Estudios *in vitro* han demostrado que nicotinamida inhibe la osteoblastogénesis. Sin embargo, existen pocos reportes con respecto al efecto en la expresión de genes que regulan la diferenciación a osteoblastos, así como del mecanismo de acción por el cual nicotinamida disminuye el avance de la diferenciación ósea. Es por ello que surge la interrogante de conocer a través de un estudio transcriptómico, los genes que están siendo afectados en el proceso de inhibición de la diferenciación osteoblástica en células tratadas con nicotinamida.

La hipótesis de trabajo es que el tratamiento con nicotinamida inhibe la expresión de los genes involucrados en la vía de señalización por BMP dependiente de Smad. Para poder evaluar esta hipótesis, nos propusimos como objetivo general: **“Caracterizar un mecanismo molecular basado en los análisis de abundancia de transcritos por el cual nicotinamida inhibe la diferenciación osteogénica”**. Los objetivos específicos de este trabajo son: **1)** “Identificar los genes involucrados en la inhibición de la osteoblastogénesis y las vías de señalización alteradas en respuesta al tratamiento con nicotinamida” y **2)** “Cuantificar los niveles de

expresión de genes involucrados en la vía de señalización por BMP dependiente de Smad”.

Para la realización de este estudio se utilizó como modelo la línea celular C2C12 de origen mesenquimal murino, la que se puede diferenciar a mioblastos o diferenciar a osteoblastos en presencia del factor de crecimiento BMP-2. Por tanto, se constituye como un buen modelo para estudiar el efecto de nicotinamida en el proceso de diferenciación osteoblastogénica. Estas células fueron cultivadas en presencia de nicotinamida y/o BMP-2 a distintos tiempos. Posteriormente se extrajo el ARN para realizar los estudios de expresión tanto por RT-qPCR como por secuenciación masiva y obtener el transcriptoma. Adicionalmente se extrajo proteínas para estudios por inmuno-ensayo por western blot para la determinación de los niveles de Smad1/5/8 fosforilados. Los resultados obtenidos muestran que nicotinamida es capaz de inhibir la diferenciación osteoblástica de manera dosis y tiempo dependiente. Se evidenció que, la expresión génica tanto del receptor ACVR1 como del factor maestro de la regulación osteogénica Runx2 es independiente del tratamiento con nicotinamida, por lo tanto el mecanismo de inhibición de la osteoblastogénesis no es a través de la disminución de la expresión de estos genes.

Al evaluar el efecto de nicotinamida sobre la activación de la vía Smad dependiente de BMP se pudo observar que en presencia de nicotinamida disminuyen los niveles de fosforilación del complejo Smad 1/5/8 a partir de las 0,5 hrs post-tratamiento. Esto indica que el mecanismo de inhibición de la osteogénesis es a través de una disminución en la activación de la vía Smad, particularmente en la reducción de la activación del complejo Smad 1/5/8. Del análisis del estudio transcriptómico mediante RNA-Seq, al comparar los distintos grupos en estudio mediante análisis multivariante se pudo determinar que los componentes del grupo tratados con nicotinamida+BMP presentan mayor similitud con el grupo control y con el grupo nicotinamida que con el grupo tratado solo con BMP-2. Adicionalmente, se pudo determinar mediante análisis de ontología génica que BMP-2 induce la activación de procesos osteogénicos, mientras que en presencia de nicotinamida, estos

procesos se ven infra representados, produciendo un efecto en las vías de PPARgamma y de NF-kappaB.

ABSTRACT

Osteoblasts are an important part of the skeletal system. They are responsible for generating the matrix of bone tissue and come from mesenchymal osteoprogenitor cells that respond to various growth factors. One of the main growth factors is bone morphogenic protein 2 (Bone Morphogenic Protein 2, BMP-2), which triggers the differentiation of progenitor cells to osteoblasts. The mutation of an Arginine residue by one of Histidine at position 206 (R206H) of the BMP type I receptor (ACVR1) generates a constitutive activation of the receptor, which eventually leads to the ossification of the soft tissues. This serious condition called Progressive Ossifying Fibrodysplasia is characterized by the progressive formation of bone in extra-skeletal sites. Different treatments have been carried out to fight the disease, however to date none has been successful. Through a pioneering treatment in our country, nicotinamide has been administered to patients with this disease. The results indicate that the advance of muscle ossification has been mitigated. In vitro studies have shown that nicotinamide inhibits osteoblastogenesis. However, there are few reports regarding the effect on the expression of genes that regulate the differentiation to osteoblasts, as well as the mechanism of action by which nicotinamide decreases the advance of bone differentiation. That is why the question arises to know through a transcriptomic study, the genes that are being affected in the process of inhibition of osteoblastic differentiation in cells treated with nicotinamide.

The working hypothesis is that the treatment with nicotinamide inhibits the expression of the genes involved in the BMP signaling pathway dependent on Smad. In order to evaluate this hypothesis, we proposed as a general objective: "Characterize a molecular mechanism based on analyzes of transcript abundance by which nicotinamide inhibits osteogenic differentiation". The specific objectives of this work are: 1) "Identify the genes involved in the inhibition of osteoblastogenesis and altered signaling pathways in response to treatment with Nicotinamide" and 2)

"Quantify the expression levels of genes involved in the pathway of signaling by BMP dependent on Smad".

In order to carry out this study, the C2C12 cell line of murine mesenchymal origin was used as a model, which can differentiate myoblasts or differentiate osteoblasts in the presence of BMP-2 growth factor. Therefore, it is a good model to study the effect of nicotinamide in the process of osteoblastogenic differentiation. These cells were cultured in the presence of nicotinamide and / or BMP-2 at different times. Subsequently the RNA was extracted to perform the expression studies both by RT-qPCR and by massive sequencing and obtain the transcriptome. Additionally, proteins were extracted for studies by immunoassay by western blot for the determination of phosphorylated Smad1 / 5/8 levels. The results obtained show that nicotinamide is able to inhibit osteoblastic differentiation in a dose and time dependent manner. It was evidenced that, the gene expression of both the ACVR1 receptor and the master factor of the osteogenic regulation Runx2 is independent of the treatment with nicotinamide, therefore the mechanism of inhibition of osteoblastogenesis is not through the decrease of the expression of these genes .

When evaluating the effect of nicotinamide on the activation of the BMP-dependent Smad pathway, it was observed that in the presence of nicotinamide, phosphorylation levels of the Smad 1/5/8 complex decreased after 0.5 h post-treatment. This indicates that the mechanism of inhibition of osteogenesis is through a decrease in the activation of the Smad pathway, particularly in the reduction of Smad complex activation 1/5/8. From the analysis of the transcriptomic study by RNA-Seq, when comparing the different groups under study by means of multivariate analysis it was possible to determine that the components of the group treated with nicotinamide + BMP presented greater similarity with the control group and with the nicotinamide group than with the treated group only with BMP-2. Additionally, it could be determined by gene ontology analysis that BMP-2 induces the activation of osteogenic processes, while in the presence of nicotinamide, these processes are under-represented, producing an effect in the PPARgamma and NF-kappaB pathways.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Osteoblastos en la formación del sistema esquelético

El sistema esquelético es fundamental en los vertebrados para proveer soporte mecánico, anclaje de los músculos, contención y protección de órganos internos, almacén metabólico participando en la regulación del equilibrio de sales de calcio y fosfatos, hematopoyesis, entre otras. El proceso de formación de los huesos, llamado osteogénesis, se inicia en etapas tempranas del desarrollo y su finalidad es la formación del esqueleto maduro. La formación de hueso comienza con la agrupación de células mesenquimales y su posterior diferenciación a condroblastos, los cuales diferencian finalmente a osteoblastos (Deschaseaux et al., 2009). Este proceso de formación de hueso a través de cartílago se denomina osificación endocondral (Hall & Miyake, 2000). Las células mesenquimales pueden diferenciarse y dar origen a distintos tipos celulares como los condroblastos, mioblastos, fibroblastos, osteoblastos, entre otros (**Figura 1**) (Caplan & Bruder 2001).

Los osteoblastos son un grupo de células especializadas encargadas de producir los componentes de la matriz ósea. Además, estos expresan genes característicos tales como colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina, fosfatasa alcalina, los que se relacionan con su función en la formación de tejido óseo (Zhang, 2010). Adicionalmente, expresan factores de transcripción como OSX y Runx2, este último es un factor de transcripción considerado el regulador maestro de la diferenciación osteogénica (Schroeder et al., 2005).

1.2 Vía de señalización en la diferenciación osteoblástica

Durante el proceso de diferenciación de células mesenquimales a osteoblastos, se identifican distintos estadios celulares; progenitor mesenquimal, preosteoblasto y osteoblasto (Long, 2012). La vía de señalización que actúa en el proceso de diferenciación es principalmente la vía dependiente de Smad, conocida también como vía canónica (Miyazono et al., 2005). Esta vía de señalización dependiente de

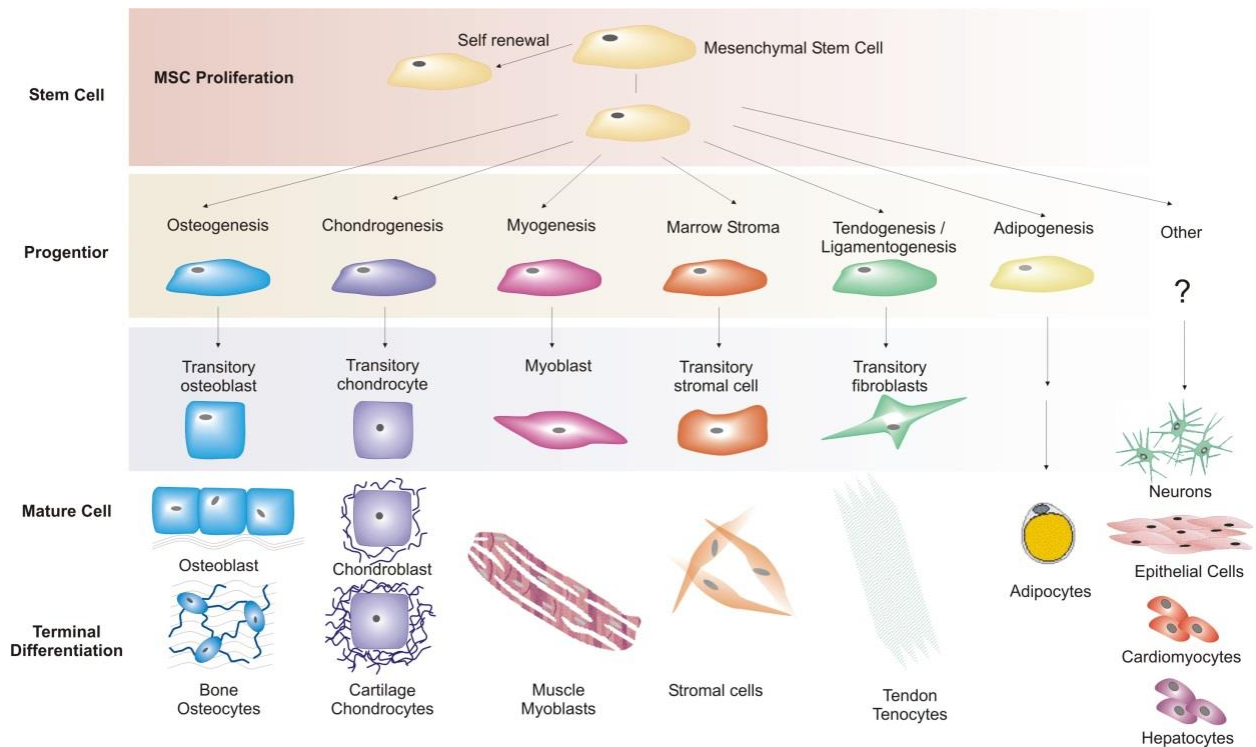


Figura 1: Potencial de diferenciación de células mesenquimales. Las células mesenquimales son capaces de diferenciarse a distintos tejidos y tipos celulares, incluyendo hueso, cartílago, músculo, tendones, tejido adiposo y existe evidencia que también pueden diferenciarse a hepatocitos, cardiomiocitos, neuronas y células epiteliales. Fuente: Adaptado de Caplan y Bruder, 2001.

proteínas Smad es activada por la Proteína morfogénica del hueso 2 (Bone Morphogenetic Protein 2, BMP-2) que es un factor de crecimiento miembro de la superfamilia del Factor de Crecimiento Transformante beta (Transforming Growth Factor, TGF- β). Algunos estudios han demostrado que BMP-2 puede inducir la diferenciación de células mesenquimales hacia osteoblastos, específicamente en la línea celular C2C12 (Katagiri et al., 1994), por lo que ha sido ampliamente utilizada como modelo de estudio de la diferenciación del linaje osteogénico. El proceso de diferenciación osteogénica se inicia cuando BMP-2 se une a dos receptores serino-treonino quinasa I (ACVR1) y II (BMPRII) formando un complejo oligomérico y produciendo su dimerización. En primer lugar, BMP-2 es reconocido por el receptor tipo II, el cual produce la fosforilación del receptor tipo I y consecuentemente lo activa (Fujii et al, 1999). Una vez activado el receptor de BMP tipo I, gatilla una cascada de señalización intracelular que produce la fosforilación de las proteínas

intracelulares Smad1/5/8, las cuales se asocian con Smad4 (Hassel et al., 2003). El complejo formado por las proteínas Smad transloca al núcleo celular activando la transcripción de Runx2, el cual es un regulador maestro que inicia la activación de la expresión de genes como osteocalcina, fibromodulina, sialoproteína ósea, colágeno tipo I, fosfatasa alcalina, Runx2, favoreciendo la diferenciación y la subsecuente síntesis de la matriz ósea (**Figura 2**) (Phinphilai et al., 2006).

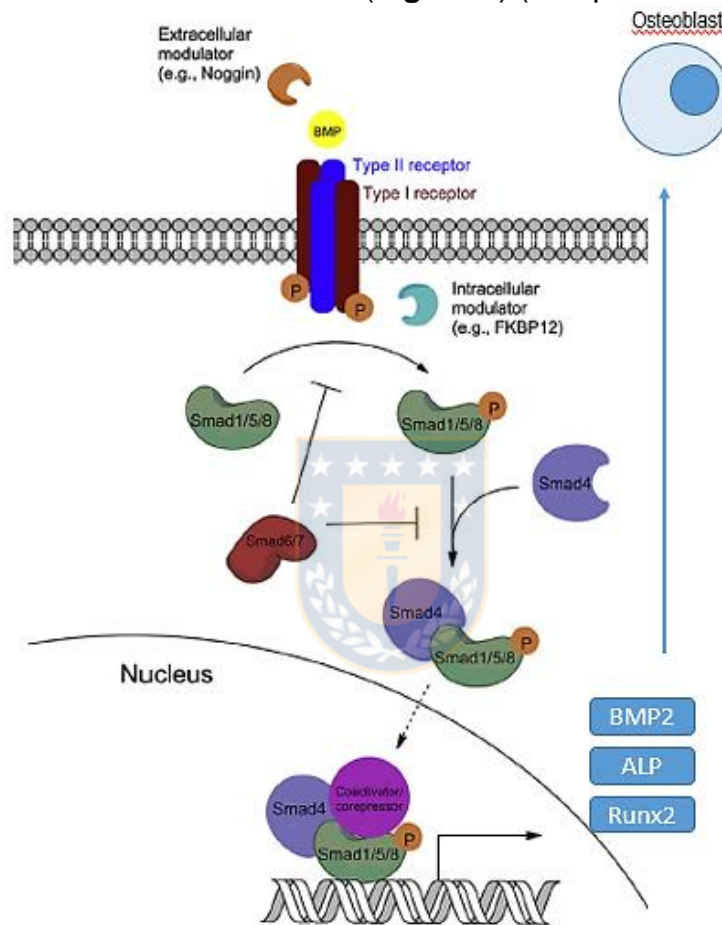


Figura 2: Vía de señalización intracelular dependiente de Smad activada por BMP. BMP, la proteína morfogénica del hueso es reconocida por receptores específicos en la membrana de células madre mesenquimáticas. Los receptores fosforilan a proteínas Smad las que translocan al núcleo para activar la expresión de genes que producen finalmente la diferenciación de estas células hacia osteoblastos. **Fuente:** Adaptado de Wang et al, 2014.

1.3 1.3 Patologías asociadas a alteraciones de la vía osteogénica

Alteraciones en el normal funcionamiento de la vía osteogénica pueden desencadenar en diversas patologías asociadas a alteraciones de los componentes

de la vía de señalización por BMPs, las que se manifiestan en una formación anómala de estructuras óseas. Dentro de estas patologías existen las denominadas Osificaciones heterotópicas (HO) en donde ocurre la formación patológica de hueso en lugares extra-esqueléticos (Ranganathan et al, 2015) (**Figura 3**). Esta condición anómala afecta a tejidos blandos del organismo como también articulaciones en donde produce, naturalmente, la rigidez de movimiento (anquilosis) y mucho dolor en la zona afectada. Se presenta como complicación en numerosas situaciones clínicas tales como trauma ortopédico, cirugías de cadera, daño neurológico (trauma cerebral), quemaduras severas, trauma de combate por amputación, daño en espina dorsal, entre otras (Ranganathan et al, 2015; Bravo-Payno et al, 1992; Cholok et al, 2018) (**Figura 3**). Esta condición causa una disminución en la movilidad de articulaciones, dolor agudo en el sitio de la osificación que es usualmente acompañado de inflamación del tejido, ulceración de la piel, entre otras (Eisenstein et al, 2018).

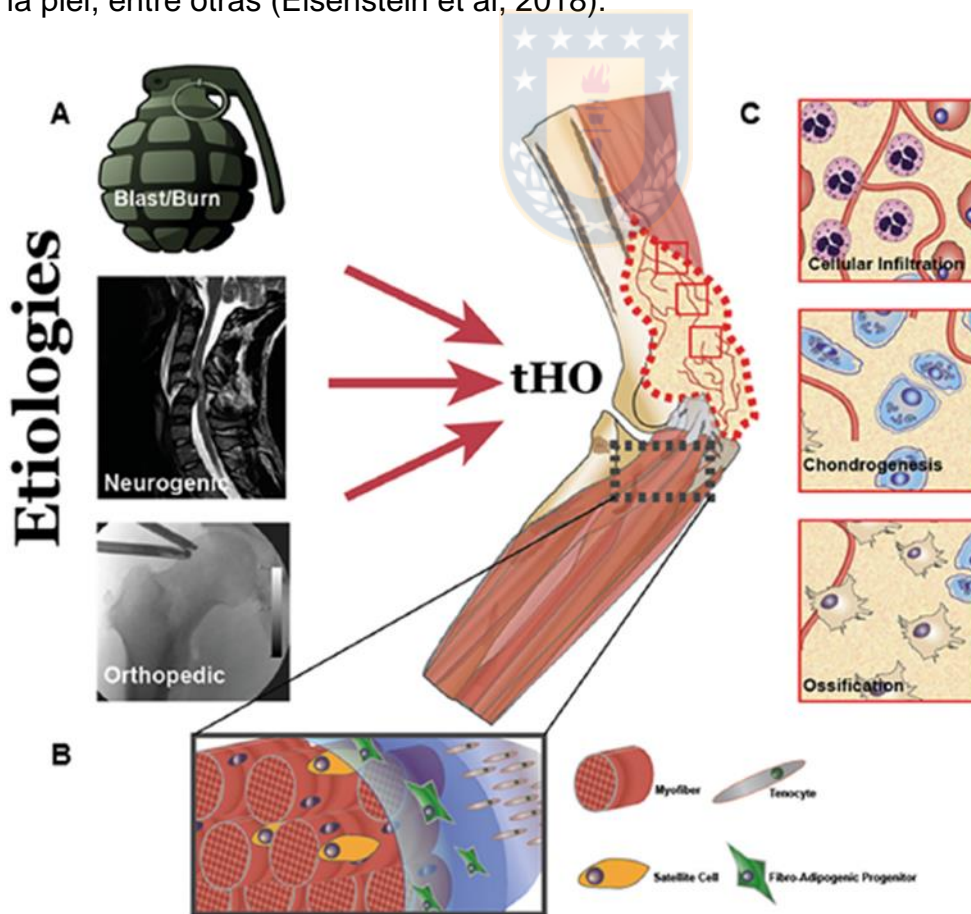


Figura 3. Desarrollo de Osificación heterotópica post-trauma. (A) Orígenes post trauma de la osificación heterotópica. **(B)** Poblaciones celulares presentes en el sitio de la lesión. **(C)** Etapas en el desarrollo celular de osificación heterotópica (obtenido de Cholok et al, 2018). Las HO pueden manifestarse por una causa adquirida o genética. Dentro de esta última categoría, una de las patologías de HO más catastróficas se relaciona con la mutación del receptor tipo I de BMP (ACVR1), el cual participa en una de las principales vías del desarrollo óseo Wang et al, 2014. La alteración corresponde a una mutación puntual en el gen que codifica para este receptor ubicado en el cromosoma 2q23-24 (617G>A) en donde se genera un cambio de arginina por histidina (R206H) en el dominio glicina serina (GS) de activación del receptor (Shore et al., 2006). Esta mutación genera la activación constitutiva del receptor ACVR1y consecuentemente, produce una desestabilización de la vía Smad por fosforilación del complejo Smad1/5/8 y, consecuentemente, produce una desestabilización de la vía Smad por fosforilación del complejo Smad 1/5/8 gatillando la diferenciación de la célula progenitora hacia linaje óseo (Culbert et al (Culbert et al, 2014). Lo anterior 2014) conlleva finalmente a una patología llamada **Fibrodiasplasia Osificante Progresiva (FOP)** (FOP) **(Figura 4)** (Pignolo et al., 2011).

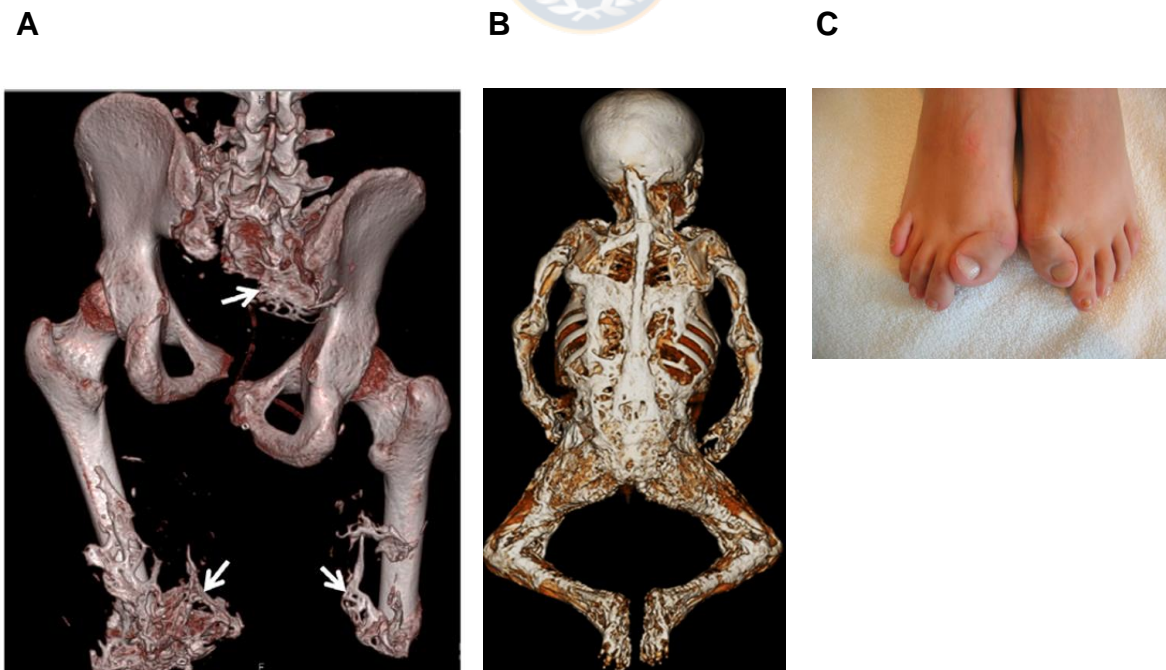


Figura 4. Patologías asociadas a alteraciones en las vías de señalización involucradas en la formación ósea. Las osificaciones heterotópicas producto de traumas por combate son muy frecuentes y se forman en los sitios de daño por amputación como puede observarse en (A). El caso más grave de osificación heterotópica se presenta en la patología Fibrodisplasia Osificante Progresiva, en donde los tejidos blandos del organismo comienzan a osificarse con el paso del tiempo y en respuesta a cualquier injuria (B). Una característica de diagnóstico de la patología FOP es la presencia de *Hallux valgus* bilateral (deformación del primer metatarsiano) en el paciente (C). Fuente: Eisenstein et al, 2018 y Pignolo et al., 2011.

1.4 Fibrodisplasia Osificante Progresiva

La Fibrodisplasia Osificante Progresiva (OMIM 135100) es una rara enfermedad genética con una prevalencia mundial de 1 en 2 millones de personas (Kaplan et al., 2008). Los individuos afectados al momento de nacer no presentan anomalías esqueléticas aparentes, excepto por una malformación en los pies en el valgo del primer metatarsiano (**Figura 4 C**), esta condición es conocida como *Hallus valgus* (Pignolo et al., 2011). La patología se caracteriza por una formación anormal de hueso trabecular en lugares extra esqueléticos (**Figura 4 B**), produciéndose una osificación espontánea, grotesca y progresiva (Kaplan et al., 2007; Thickman et al, 1982; Thickman et al, 1982). Los brotes de osificación comienzan a reemplazar el músculo esquelético y otros tejidos conectivos a través de un proceso de osificación endocondral, esto es a través de una diferenciación de las células a condrocitos que producen cartílago, el cual posteriormente se convierte en hueso, esto es a través de una diferenciación de las células a condrocitos que producen cartílago, el cual posteriormente se convierte formando un segundo esqueleto (Kaplan et al., 2008; Kaplan et al, 1993; Kaplan et al, 1993). El más mínimo trauma, golpe o fatiga de los músculos u otros tejidos, incluso inyecciones por tratamientos dentales desencadenan la aparición de dolorosos brotes de formación ósea llevando a un avance de la osificación progresiva característica de la patología (Pignolo et al., 2011). Es por ello que las cirugías cuyo objetivo es remover el hueso ectópico son a menudo contraproducentes ya que generan nuevos episodios de dolorosos brotes de crecimiento óseo (Kaplan et al., 2008).

Todo lo anterior, conduce finalmente a la completa inmovilización de los pacientes (Diaz de la Torre., 2012), siendo confinados a una silla de ruedas cuando alcanzan los treinta años de edad requiriendo asistencia de por vida para realizar actividades cotidianas (Kaplan et al., 2007). El promedio de sobrevivencia de estos pacientes es alrededor de los 41 años, la causa de muerte a menudo resulta de complicaciones producidas por síndrome de insuficiencia torácica o falla cardio-respiratoria o falla cardio-respiratoria (Kaplan et al, 2007; Kaplam et al, 2010; Kaplan et al, 2010).

1.5 FOP y el Sistema Inmune

La evidencia experimental ha dilucidado una potencial participación del sistema inmune innato en la patología FOP. La presencia de macrófagos, linfocitos y mastocitos en lesiones tempranas de FOP, y los efectos benéficos de anti-inflamatorios en etapas tempranas de eventos de osificación apoyan la participación del sistema inmune en las lesiones producidas en pacientes que presentan la patología (Pignolo et al., 2013). Otros investigadores, utilizando modelos de ratón, demostraron que las células progenitoras que contribuyen a la osificación ectópica eran mayormente progenitores endoteliales que respondían a gatillantes inflamatorios (Lounev et al., 2009). Estudios recientes utilizando ratones Knock-in para *Acvr1* muestran que en etapas tempranas de lesiones ocurre una destrucción de musculo esquelético que es acompañada de una gran respuesta inflamatoria. Dentro de estos tejidos dañados se encontraron linfocitos CD45+ y una gran cantidad de células polimorfonucleares rodeando las miofibras (Chakkalakal et al., 2012).

1.6 Tratamientos preventivos en HO

Existe aún poco consenso en determinar cuál es el método profiláctico más efectivo para la prevención de HO. La selección apropiada de un tipo de tratamiento es un tanto compleja debido a la variabilidad de los agentes etiológicos que promueven la formación de hueso ectópico. No obstante lo anterior, el tratamiento más común es la utilización de agentes anti-inflamatorios (e.g. AINES), bajas dosis de radiación localizada en el lugar del trauma o una combinación de ambos (Baird & Kang 2009).

Sin embargo, la radioterapia puede producir efectos desproporcionadamente negativos sobre los progenitores mesenquimales, por lo que su utilización debe ser considerada con suma cautela.

1.7 Terapias utilizadas para el tratamiento de FOP

Con respecto a FOP, Con respecto a FOP, se han propuesto diversas estrategias terapéuticas para frenar el avance de la osificación de tejidos blandos tejidos blandos, algunas de ellas son el uso de anticuerpos dirigidos contra los receptores de BMP-2, inhibidores de la actividad quinasa del receptor ACVR1, siRNAs, y el uso de antagonistas de BMP (Kaplan et al, 2009). El tratamiento actual más utilizado es la aplicación de altas dosis de glucocorticoides (Kaplan et al, 2008). Sin embargo la corticoterapia pierde su efectividad al cabo de pocas semanas, por lo que no es recomendada para tratamientos a largo plazo (Brantus & Meunier 1998). También se han usado agentes farmacológicos anti-resortivos como los Bifosfonatos (Haran et al, 2004), los cuales afectan la actividad tanto de osteoblastos como de osteoclastos. Son utilizados en una variedad de situaciones clínicas tales como osteoporosis, metástasis ósea, osteogénesis imperfecta, enfermedad de Paget, entre otras. Poseen una alta afinidad por el hueso mineralizado debido a que se une a cristales de hidroxapatita y son incorporados preferentemente en sitios activos de remodelamiento óseo inhibiendo de esta forma la resorción ósea (Russell et al, 1970) mediante un mecanismo de apoptosis de los osteoclastos involucrados en la degradación de la matriz mineral ósea (Drake et al, 2008).

La utilización de estos agentes anti-resortivos debe considerarse minuciosamente debido a que se ha demostrado que pueden producir efectos adversos a quienes se administra, en donde se ha observado un aumento del riesgo de fracturas, como también la aparición de osteonecrosis mandibular (Woo et al, 2006). Adicionalmente, algunos estudios han concluido que su utilización no es del todo eficaz en la disminución de HO (Haran et al, 2004; Shafer et al, 2008; Sagi et al, 2014). Con todo lo anterior, hasta la fecha no existe un tratamiento efectivo para combatir o prevenir la aparición de brotes de osificación heterotópica.

1.8 Utilización de Nicotinamida en pacientes con FOP

Recientemente, investigadores como el grupo de Quevedo y colaboradores (Quevedo & Díaz, 2014), han dilucidado un potencial uso clínico de nicotinamida para el tratamiento de pacientes con FOP. Nicotinamida es la forma amida de la vitamina B₃, es un potente agente anti inflamatorio capaz de inhibir citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF α (Ungerstedt et al, 2003), puede ser obtenida a través de la síntesis en el organismo o por medio de la dieta (Maiese et al, 2009). Una vez que nicotinamida es incorporada al organismo, funciona como un precursor de la coenzima NAD⁺ y también es esencial para la síntesis de NADP⁺ (Maiese et al, 2009; Hwang & Song 2017). Al ingresar Nicotinamida (NAM) a la célula, es convertida a Nicotinamida Mononucleotido (NMN) por la enzima NAMPT, el cual posteriormente puede convertirse a NAD⁺, NADH o NADPH (**Figura 5**). Es una molécula hidrosoluble y es rápidamente absorbida a través del epitelio gastrointestinal (Maiese et al, 2009). Al ser hidrosoluble, nicotinamida puede ser administrada disuelta en agua y por vía oral, ofreciendo así una gran ventaja frente a otros tratamientos que generan trauma en los tejidos (Ej: inyecciones, cirugías). Es así como, mediante un tratamiento pionero en nuestro país, se ha administrado nicotinamida a pacientes que padecen de FOP en dosis no superiores a los 3 g por día (Quevedo & Díaz, 2014). Al momento del tratamiento los pacientes presentaban brotes de osificación de tejidos blandos, como también habían desarrollado rigidez progresiva del cuello, espalda y hombros. Posterior a la administración de nicotinamida por vía oral, los investigadores notaron una rápida disminución de la inflamación local durante la semana después de la aparición de los brotes. Por otra parte, antes del tratamiento con nicotinamida, los brotes de osificación se observaban cada 3 semanas en promedio, en cambio, después del tratamiento realizado aproximadamente por 5 años, solo se observaron 4 brotes, de los cuales 3 fueron provocados por traumas. Adicionalmente, ambos pacientes recuperaron movilidad tanto del cuello como de los hombros (Quevedo & Díaz, 2014).

1.9 Nicotinamida en la diferenciación osteoblástica

El historial clínico de estos pacientes tratados con nicotinamida muestran una disminución tanto en la inflamación de zonas afectadas como en la inflamación de zonas afectadas como de la progresión de la osificación y, junto con ello, una mejora en la movilidad. Sin embargo, el mecanismo por el cual el tratamiento farmacológico inhibe la diferenciación de células mesenquimales a osteoblastos es algo muy poco explorado. Algunos estudios de diferenciación de células mesenquimales a osteoblastos *in vitro* utilizando nicotinamida han mostrado una inhibición de la osteoblastogénesis. En células madre mesenquimales C3H10T/2 y cultivos primarios de médula ósea de ratón se ha observado que al ser tratadas con nicotinamida disminuye la diferenciación de estas células a osteoblastos además de inhibir la mineralización (Bäcjesjö et al, 2006).

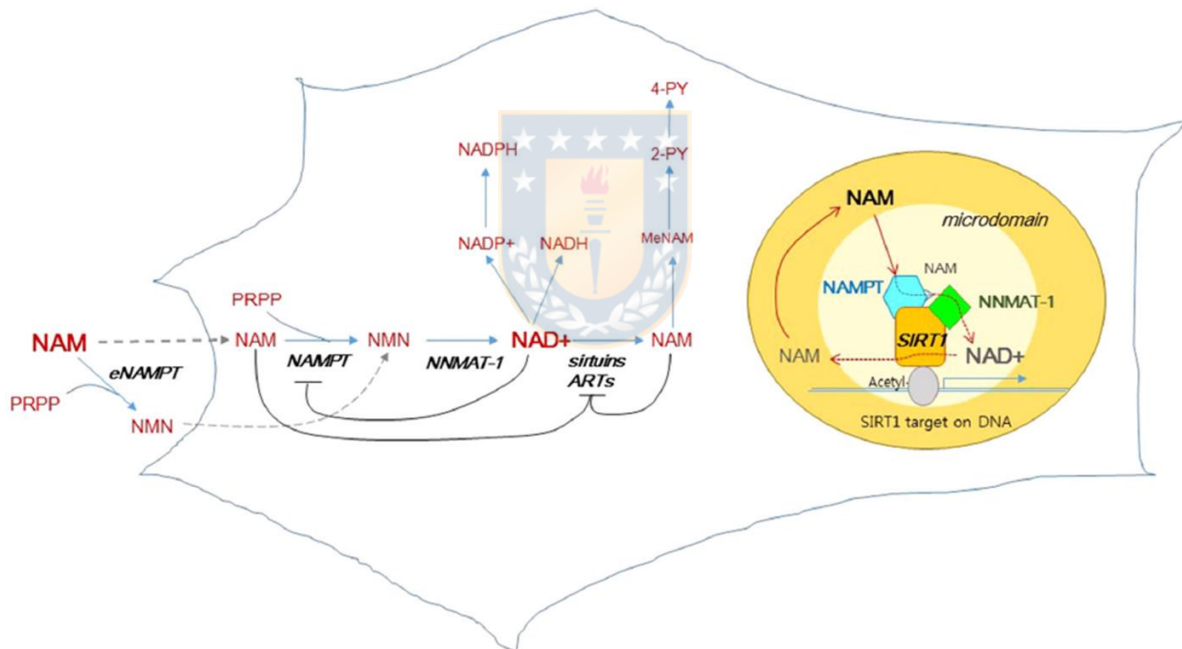


Figura 5. Metabolismo intracelular de Nicotinamida. Después de la administración, nicotinamida (NAM) es transportada hacia el citosol en donde reacciona con PRPP para producir NMN el cual es posteriormente adenilado para producir NAD⁺ a través de las actividades catalíticas de NAMPT y NNMAT-1. Una pequeña fracción es reducida de NAD⁺ a NADH o fosforilada para generar NADP⁺, el cual puede ser reducido a NADPH. NAD⁺ también puede ser convertido a nicotinamida mediante la acción catalítica de enzimas como Sirt1 y ADP (ribosa) transferasas (ARTs). De esta forma, al ser nicotinamida un subproducto de estas reacciones puede inhibir la actividad de estas enzimas NAD⁺

dependientes. En el núcleo NNMAT-1 colocaliza con Sirt1 y facilita el suministro de NAD⁺ para la actividad enzimática de Sirt1. Fuente: Hwang & Song 2017.

Igualmente, otras investigaciones han reportado que células pre-osteoblásticas tratadas con nicotinamida a distintas concentraciones mostraron una disminución significativa de la síntesis de colágeno tipo I y de Runx2. Adicionalmente también se ha reportado que nicotinamida bloquea la diferenciación osteogénica y favorece la diferenciación a adipocitos de células madre mesenquimales extraídas de ratón (Shakibaei et al, 2012).

Estos antecedentes muestran que nicotinamida inhibe la osteoblastogénesis, no obstante, aún no se ha determinado el conjunto de genes involucrado en este proceso ni el mecanismo por el cual ocurre la inhibición. Determinar cómo cambian los patrones de expresión génica frente al tratamiento con nicotinamida es crucial para poder dilucidar el mecanismo molecular por el cual estaría actuando y posteriormente, poder diseñar una terapia específica de inhibición de HO. Es por esto que nos formulamos la siguiente pregunta:

¿Qué genes se ven afectados en el proceso de inhibición de la diferenciación osteoblástica en células tratadas con nicotinamida?

Para contestar esta pregunta es necesario utilizar aproximaciones que nos permitan determinar los niveles de expresión de genes a nivel de ARN mensajero, obteniendo así una visión global del efecto de nicotinamida en genes que participan en la diferenciación. Se hace necesario entonces el estudio del perfil de expresión génica para identificar específicamente los genes afectados por el tratamiento, realizando un análisis del transcriptoma.

1.10 Transcriptoma y tecnología de secuenciación RNA-Seq

El transcriptoma se compone del conjunto completo de transcritos y su abundancia en una célula, para un estado específico del desarrollo o condición fisiológica (Wang et al, 2009). Conocer el transcriptoma es esencial para revelar los constituyentes moleculares de células y tejidos, como también para la comprensión de la génesis de las enfermedades (Wang et al, 2009). Una tecnología que nos permite dilucidar

lo anterior es la secuenciación masiva de ARN de próxima generación, denominada RNA-Seq (Ozsolak & Milos 2011).

La tecnología de secuenciación RNA-Seq se ha posicionado como el método preferido para análisis transcriptómicos ya que puede detectar amplios rangos de niveles de expresión (Wang et al, 2009). Una de las mayores ventajas de esta tecnología es la obtención de una gran cantidad de datos a bajo costo y en un menor período de tiempo (Mutz et al, 2013). De esta forma, el RNA-Seq nos permite conocer a nivel global los cambios de expresión en los componentes afectados por efecto del tratamiento con nicotinamida.

Con los datos obtenidos de la secuenciación RNA-Seq hemos podido determinar, mediante un análisis de expresión diferencial *in silico* los genes que están aumentados o disminuidos en su expresión asociados a la exposición con nicotinamida. Posteriormente, con análisis **ontológico de estos genes** hemos podido establecer su participación en rutas metabólicas involucradas en la respuesta de la línea celular al tratamiento con nicotinamida.



1.11 Modelo de estudio

Para poder estudiar la diferenciación osteogénica se necesita de un buen modelo que permita identificar claramente células diferenciadas a osteoblastos, como también células indiferenciadas. Un buen modelo para realizar estos estudios es la línea celular derivada de ratón C2C12. Estas células de origen mesenquimal, normalmente diferencian a mioblastos cuando alcanzan confluencia, fusionándose para formar células multinucleadas y dar origen a los miotubos, los cuales son componentes fundamentales de las células musculares (Burattini et al, 2004). Por otra parte se ha demostrado ampliamente en la literatura científica que esta línea celular puede diferenciar a osteoblastos si se cultiva en presencia del factor de crecimiento BMP-2 (Katagiri et al, 1994), ya que este produce una inhibición de la actividad transcripcional del factor de transcripción maestro de la regulación miogénica MyoD (Katagiri et al, 1997). Debido a lo anterior la línea celular C2C12 se establece como un buen modelo para estudiar la diferenciación osteoblástica y

los efectos de nicotinamida en este proceso. y los efectos de Nicotinamida en este proceso.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Los osteoblastos forman parte importante del sistema esquelético, ya que son los encargados de generar la matriz del tejido óseo. Estos osteoblastos provienen de células mesenquimales osteoprogenitoras que responden frente a diversos factores de crecimiento, dentro de ellos uno de los más importantes es BMP-2, el cual gatilla la diferenciación de las células progenitoras a osteoblastos activando principalmente la vía de señalización dependiente de Smad, en donde los complejos proteicos formados por estas proteínas Smad translocan al núcleo activando la expresión de genes que producen finalmente la diferenciación a linaje óseo. Una de las patologías más catastróficas asociada a alteraciones en la vía de señalización por BMPs se relaciona con la mutación del receptor tipo I de BMP (ACVR1). Mediante un tratamiento absolutamente pionero en nuestro país se ha administrado nicotinamida a pacientes que presentan esta enfermedad. Los resultados indican que se ha logrado atenuar el avance de la osificación heterotópica. Además, estudios *in vitro* han demostrado que nicotinamida inhibe la osteoblastogénesis y que produce una disminución en la expresión de *RUNX2*. Sin embargo, es muy poco lo que se ha reportado con respecto al efecto en la expresión génica de genes clave que regulan la diferenciación a osteoblastos, ni cual es el mecanismo de acción por el cual nicotinamida disminuye el avance de la proliferación ósea.

Con todos los antecedentes anteriormente señalados se propone la siguiente hipótesis: **“Nicotinamida inhibe la expresión de los genes involucrados en la vía de señalización por BMP dependiente de Smad”**.

OBJETIVO GENERAL

“Identificar un mecanismo molecular basado en análisis de abundancia de transcritos por el cual nicotinamida inhibe la diferenciación osteogénica”.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1- “Identificar los genes involucrados en la inhibición de la osteoblastogénesis y las vías de señalización alteradas en respuesta al tratamiento con nicotinamida”

2-“Cuantificar los niveles de expresión de genes involucrados en la vía de señalización por BMP dependiente de Smad”

Para ello se realizó una secuenciación de transcriptoma (RNA-Seq) a fin de determinar la abundancia de mensajeros de los genes cuya expresión podría verse afectada por el tratamiento con nicotinamida. Esto permitió además identificar las vías de señalización en la cual están participando los genes cuyos niveles de transcritos hayan aumentado o disminuido en respuesta al tratamiento, obteniendo de esta forma una visión global de los procesos celulares que se ven alterados y la función molecular de acuerdo a una clasificación jerárquica ontogénica.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cultivo celular

Se utilizó como modelo de estudio la línea celular pre-mioblástica C2C12 la cual se obtuvo del European Cell Culture (ECCAC). Las células se cultivaron en medio de crecimiento Eagle modificado de Dulbecco DMEM alto en glucosa (Thermo), suplementado con 10% de Suero Bovino Fetal (Gibco), penicilina/estreptomicina (100U/mL Penicilina y 100µg/mL de estreptomicina) y L-glutamina (Thermo) en incubadora a 37°C en atmosfera de 5% CO₂. Para los estudios de diferenciación osteoblástica, se sembró una cantidad de $3,5 \times 10^5$ en placas de cultivo de 100-mm por 24 horas. Luego el medio de cultivo se reemplazó por medio depletado de SBF y reemplazando este por albúmina de suero bovino BSA (Sigma-Aldrich, A1595) a una concentración de 0,25% por otras 24 horas. Posterior a las 24 horas de haber cambiado el medio, las células se trataron por 16 horas con BMP-2 recombinante (Thermo Fisher, PHC7141) a una concentración de 500 ng/mL y/o nicotinamida a una concentración de 20mM (Sigma-Aldrich, N0636) en medio DMEM suplementado con 2% de SBF a 37°C en atmosfera de 5% de CO₂. Paralelamente se cultivaron células en las mismas condiciones, pero sin tratamiento, las que se utilizaron como control, como se esquematiza en la **figura 6**. El número de réplicas que se utilizó fue de 4.

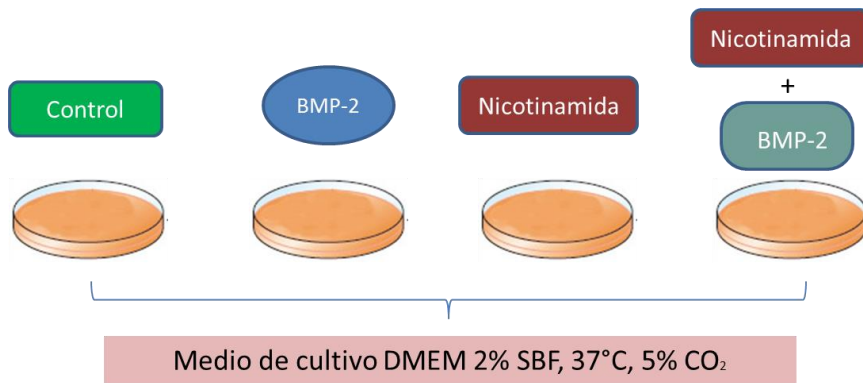


Figura 6. Diseño experimental de los tratamientos. Se utilizó como modelo *in vitro* la línea celular C2C12 proveniente de ratón. Se realizaron cuatro tratamientos con cuatro réplicas independientes, los cuales se incubaron por 0, 0.5, 2, 4, 16, 24 y 48 horas. La concentración de nicotinamida de 20 mM es equivalente a la utilizada en los ensayos clínicos de pacientes con FOP. Fuente: Elaboración propia

3.2 Extracción de ARN

Previo a la extracción de ARN a las placas de cultivo se les realizó dos lavados con PBS1X (NaCl 137mM, Merck; KCL 2,7mM, Merck; Na₂HPO₄*2H₂O 4,3mM, Merck; KH₂PO₄*2H₂O 1,4mM, Merck, ajustando el pH a 7,4). Para la lisis directa de las células, se utilizó 1 mL del reactivo TRIzol (Invitrogen) por placa de cultivo de 100mm (BD Falcon). Las células fueron resuspendidas e incubadas durante 5 minutos a temperatura ambiente, permitiendo la disociación del complejo nucleoproteico. Tras ello, las células se centrifugaron a 12000 g durante 10 minutos a 4 °C, descartando el sedimento. El sobrenadante obtenido, se utilizó para la extracción de ARN total por medio del producto DirectZol™ RNA mini prep kit (Zymo research, #R2050) siguiendo las instrucciones del proveedor. Brevemente, a la muestra de ARN en TriZol se agregó un volumen de etanol 100% (Merck) homogenizando la mezcla. Posteriormente la muestra fue transferida a la columna Zymo-Spin™ IIC Column inserta en un tubo colector, se llevó a centrifugación a 12000 g por 30 segundos a una temperatura de 4° C y se descartó el sobrenadante. Luego se realizó un tratamiento con DNasa I directamente sobre la columna para eliminar posibles contaminaciones con ADN genómico. Finalmente, se eluyó el ARN agregando a la columna 50 µL de agua libre de DNAsas/RNAsas y se llevó a

centrifugación a 12000 g por 30 segundos a temperatura ambiente. La muestra de ARN total eluida se almacenó a -70° C para su posterior análisis y utilización.

3.3 Cuantificación y determinación de Integridad del ARN

Una vez obtenidas las muestras de ARN total se procedió a determinar su concentración e integridad. Para determinar la concentración de cada muestra se utilizó el kit de cuantificación de ARN Qubit® RNA BR Assay Kit (Life Technologies) tomando 1 µL de cada muestra y mezclando con el buffer y el fluoróforo como indican las instrucciones del fabricante. Posteriormente, utilizando tubos de microcentrífuga de 0,5 mL de pared delgada (Axygen®), se llevaron al equipo Fluorímetro Qubit® 2.0 (Life Technologies) previamente calibrado con los estándares como lo indica el protocolo como lo indica el protocolo.

Para la determinación de la integridad de las muestras de ARN se llevó a cabo una electroforesis en gel de Agarosa (Omnipure®) al 1% p/v disuelta en tampón TAE 1X (Winkler; Tris 4,84 g/L, ácido acético glacial 0,11% v/v y EDTA 0,37 g/L, pH 8,4) preparado con agua DEPC (Winkler). Se verificó su integridad analizando 0,2 µg de ARN junto a un volumen de tampón de carga (Fermentas: Tris-HCl pH 7.6 10 mM, azul de bromofenol 0.03%, xylene cyanol FF 0.03%, glicerol 60%, EDTA 60 mM) correspondiente a la sexta parte del volumen total de carga. Al gel de agarosa se le adicionó el colorante Sybr® Safe Gel Stain 10.000X (Invitrogen) a una dilución 1:10.000 y tampón TAE 1X, el cual se utilizó también como tampón de corrida. La separación de ARN se realizó en cámara electroforética (RunVIEW Gel System, Cleaver Scientific) a diferencia de potencial constante de 70 V por 60 minutos. Las bandas de ARN se visualizaron en un equipo transiluminador Axxygen® Gel Documentation System (Axygen modelo GD-1000) con luz ultravioleta (UV) a 340 nm.

3.4 Síntesis de ADN copia (ADNc)

La obtención de ADNc se realizó mediante la técnica de transcripción reversa (RT). Para ello, se utilizó un sistema de transcripción reversa M-MLV (Promega M170B). De las muestras de ARN purificadas previamente se tomaron 2 µg y se mezclaron

en tubos de PCR de 0,2 mL (Axygen™) con 0,5 µg de oligo (dT) (Promega) y agua libre de nucleasas Hyclone™ Hypure Molecular Biology Grade Water (GE-Healthcare) alcanzando un volumen final de 15 µL. Posteriormente, la mezcla se incubó en un termociclador (Life Express, modelo TC-96/G/H) a una temperatura de 70 °C durante 5 minutos para linealizar el ARN y luego a 4 °C durante 5 minutos (mezcla de linealización). Una vez finalizada la incubación los tubos fueron colocados en hielo para evitar la formación de estructuras secundarias. La mezcla de reacción de RT se preparó en tubos de PCR con los siguientes reactivos: Tampón de reacción M-MLV 5X (Promega), dNTPs 0,5 mM (Promega), inhibidor de RNasa RNasin® 25 U (Promega), 1 µL de transcriptasa reversa M-MLV RT (Promega) y agua libre de nucleasas, alcanzando un volumen final de 25 µL. La mezcla de reacción se sometió a un ciclo de PCR de 42 °C durante 60 minutos en el termociclador anteriormente descrito. Se realizó un control negativo de transcripción reversa (no-RT) el cual no incluyó la enzima M-MLV RT.

3.5 PCR en tiempo real

Esta técnica permite cuantificar los productos de amplificación por PCR de muestras de cDNA de genes de interés, esto se logra mediante amplificación y acumulación de ADN de doble hebra. La cantidad de ADN amplificado es detectado a través del reactivo SYBR Green I. Este reactivo es un intercalante de ácido nucleico, específico para ADN doble hebra, el cual si se excita a una determinada longitud de onda emite una señal fluorescente. Para realizar la PCR en tiempo real se utilizaron los cDNA producidos mediante la retro-transcripción anteriormente descrita. Se utilizó el kit de PCR Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master mix (2X)(Thermo Fisher K0223). Para la reacción de PCR se preparó una master mix agregando los siguientes componentes: 6,25 µL de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X), Partidor Forward 10 µM (0,375 µL), Partidor Reverse 10 µM (0,375 µL), cDNA templado 2 µL (de la solución stock diluida 1:5), agua libre de nucleasas hasta completar un volumen final por reacción de 12,5 µL. El listado de los genes estudiados, junto a la secuencia de los partidores y su correspondiente código de referencia del Gen Bank del NCBI se muestra en la Tabla 1. Se agregó además un control sin templado de cDNA (Non-Template control). Las temperaturas utilizadas

en cada etapa para cada set de partidores se indican en la Tabla 2. En todos los ensayos se utilizó el equipo Mx 3000P (Stratagene) y se visualizaron los resultados en el programa MxPro. Para el análisis de expresión génica se utilizó el método del $\Delta\Delta$ Ct (Delta- Delta Ct) (Schmittgen & Livak 2008) y el análisis estadístico fue realizado con el programa GraphPad Prism 6.

Tabla 1 Lista de secuencia de partidores utilizados para la PCR en tiempo real.

Gen Target	Secuencia	Tamaño producto	Referencia
<i>Runx2</i>	F: 5'- AAA ACC AAG TAG CCA GGT TC-3' R: 5'- TCA TAC TGG GAT GAG GAA TG-3'	246	NM_001145920.2
<i>Acvr1</i>	F: 5'- GGA GTT GCT CTC AGG AAG TT-3' R: 5'- GAC ACA CTC CAA CAG GGT TA-3'	216	NM_001110204.1
<i>Fmod</i>	F: 5'- CGG TTG TCT CAC AAC AGT CT-3' R: 5'- GCA GCT TGG AGA AGT TCA T-3'	217	NM_021355.3
<i>Snrpd3</i>	F: 5'-ATT GGT GTG CCG ATT AAA G-3' R: 5'-TGT CAG GCA AAA TCA GAA AT-3'	220	NM_026095.4

Abreviaciones: F, forward primer; R, reverse primer.

Tabla 2 Perfil térmico de los ciclos de PCR en tiempo real

N° de Ciclos	Etapas	<i>Runx2</i>	<i>Acvr1</i>	<i>Fmod</i>	<i>Snrpd3</i>
1	Denaturación inicial	95°C /10 min	95°C /10 min	95°C /10 min	95°C /10 min

30	Denaturación	95°C /30 seg	95°C /30 seg	95°C /30 seg	95°C/30 seg
	Alineamiento	58°C/30 seg	58°C/30 seg	58°C/30 seg	58°C/30 seg
	Extensión	72°C/30 seg	72°C/30 seg	72°C/30 seg	72°C/30 seg
1	Extensión final	72°C/5 min	72°C/5 min	72°C/5 min	72°C/5 min

3.6 Identificación de osteoblastos por tinción

Para poder identificar células que se diferenciaron a osteoblastos se utilizó una solución de tinción que contiene un sustrato específico para la fosfatasa alcalina presente en células diferenciadas. Como resultado de la actividad fosfatasa, el sustrato naphthol es liberado e inmediatamente se asocia con la sal de diazonio formando un producto coloreado insoluble. Para preparar la solución de tinción, se procedió a disolver una cápsula de Fast Blue RR Salt (Sigma-Aldrich, FBS25) en 48 mL de agua destilada. Luego se agregó 2 mL de naphthol AS-MX Phosphate (Sigma-Aldrich, 855-20mL) y se mezcló la solución hasta homogenizar. Las células en cada pocillo fueron fijadas en una solución de paraformaldehído al 4% por 10 minutos a temperatura ambiente, luego de lo cual fueron lavadas con PBS 1X. A continuación se agregó a cada pocillo 500 µL de la solución de tinción anteriormente descrita y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de incubación, se removió la solución de tinción y se lavó dos veces con agua destilada. Las células fueron observadas y fotografiadas bajo microscopio óptico convencional.

3.7 Ensayo de cuantificación de la actividad de Fosfatasa alcalina

Con el objetivo de cuantificar la actividad de la fosfatasa alcalina, la cual es un marcador de diferenciación de osteoblastos, se utilizó el kit Alkaline Phosphatase Activity Colorimetric Assay Kit (BioVision, Inc., Milpitas, #K412-500). Células C2C12 se cultivaron en placas de 96-pocillos bajo condiciones normales y nicoA/BMP-2 a las concentraciones anteriormente referidas por 24 y 48 horas. Al finalizar los tiempos de tratamiento, las células se lavaron con PBS 1X dos veces y se

homogenizaron en 50 μ L de Tampón de ensayo (Referido en el kit como Assay Buffer). Luego, se agregó 50 μ L de una solución de pNPP 5mM a cada muestra y se mezcló. Se incubaron las muestras por 60 minutos a 25°C protegidas de la luz. La reacción fue subsecuentemente detenida mediante la adición de 20 μ L de solución stop. Las muestras se llevaron a lector de microplacas para medir la densidad óptica a 405 nm utilizando el equipo Victor 3 Multilabel Counter (Perkin Elmer-Wallac, model 1420-014). El cálculo de la actividad de fosfatasa alcalina se realizó según la fórmula $ALP \text{ activity} = A/V/T$, donde A es la cantidad de pNP generada en las muestras (μ mol), V es el volumen de la muestra añadida en mL, y T es el tiempo de reacción en minutos. La curva estándar de formación de pNP se realizó según las instrucciones del fabricante.

3.8 Extracción de proteínas totales

Células C2C12 se cultivaron en placas de cultivo de 100 x 20 mm (Axygen) y expuestas a BMP-2 (500 ng/mL) y/o nicotinamida (20mM) por 0, 0.5, 2 y 4 horas. Luego las células se lavaron 2 veces con PBS 1X (NaCl 137mM, Merck; KCl 2,7mM, Merck; $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 4,3mM, Merck; $KH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 1,4mM, Merck, ajustando el pH a 7,4) pre-calentado a 37°C. Posteriormente para extraer proteínas totales se utilizó el kit comercial NucleoSpin® RNA/Protein (Macherey-Nagel). Para ello, se lisaron las células en placa de cultivo con 350 μ L de Buffer RP1 y 3.5 μ L de DTT (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 20mM. Las células lisadas se transfirieron a una columna NucleoSpin® Filter (violet ring) inserta en un tubo colector y se centrifugó a 11.000 g por 1 minuto. Se descartó la columna y al eluido se le agregó 350 μ L de Etanol al 70% (Merck). Posteriormente, se traspasó el sobrenadante a columnas NucleoSpin® RNA/ Protein Column (light blue ring) y se llevaron a centrifugación a 11.000 g por 30 segundos colectando el sobrenadante. Para realizar la precipitación de las proteínas el sobrenadante obtenido en el paso anterior se transfirió a un tubo de microcentrifuga de 2 mL y se añadió un volumen de Protein precipitator y se mezcló vigorosamente, luego, se incubaron las mezclas a temperatura ambiente por 10 minutos. Después de la incubación cada tubo se centrifugó a 11.000 g por 5 minutos, se removió el sobrenadante y se agregó 500 μ L de etanol al 50% (Merck) al pellet de proteínas, centrifugando a 11.000 g por 1

minuto. Terminada la centrifugación se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el pellet por 5 a 10 minutos a temperatura ambiente. La cuantificación de la concentración de proteínas se llevó a cabo en Fluorímetro Qubit® 2.0 (Invitrogen) con el kit Qubit Protein Assay Kits (Life Technologies, Q33212) según las indicaciones del proveedor. Cada muestra de proteínas se mezcló con Agente reductor Bolt™ ample Reducing Agent (10X), Buffer de carga Bolt™ LDS Sample Buffer (4X), quedando ambos reactivos a una concentración final de 1X. Posteriormente las muestras se calentaron a 100° C durante 5 minutos, tras lo cual fueron centrifugadas a 10.000 g durante 5 minutos.

3.9 Inmunodetección por Western Blot

Cada muestra fue sembrada en un gel de poliacrilamida prefabricado NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Gel (Invitrogen, NP0321BOX). La electroforesis se llevó a cabo en cámara Mini Gel Tank (Thermo Scientific, A25977) a voltaje constante de 200 V en tampón de corrida NuPAGE™ MES SDS Running Buffer 20 X (Thermo Scientific, NP0002) (50 mM MES, 50 mM Tris Base, 0,1% SDS, 1mM EDTA, pH 7.3). Las proteínas fueron transferidas desde el gel hacia una membrana de nitrocelulosa (Thermo Scientific, 88018) según el método descrito por Towbin y colaboradores (Towbin et al, 1979). Para ello, se dispuso la membrana en contacto directo con el gel de poliacrilamida. Tanto la membrana de nitrocelulosa como el gel se cubrieron directamente con papel filtro N° 3 (Whatman), y se utilizaron esponjas en la parte exterior. Los cassettes se cerraron e instalaron en cámara de transferencia (Bio-Rad) con el gel hacia el polo negativo (cátodo) y la membrana hacia el polo positivo (ánodo). La transferencia se realizó a intensidad eléctrica constante (250 mA) en tampón de transferencia (Tris-HCL, 48 mM; Glicina, 39 mM; Metanol 20% v/v) por 2 horas. La efectividad de la transferencia se verificó mediante tinción de la membrana con una solución de Rojo Ponceau (Ponceau 0,1%; ácido acético al 5% v/v) por 5 minutos en agitación a temperatura ambiente, luego de ello, se decoloró la membrana con agua destilada hasta la visualización de las bandas de proteínas. Para el bloqueo de sitios inespecíficos se utilizó una solución de bloqueo compuesta de leche descremada al 5% p/v ó una solución de BSA al 5 % p/v (Sigma) en PBS-Tween cubriendo totalmente la membrana en agitación por 2 horas a temperatura

ambiente. Tras un lavado de 15 minutos y tres de 5 minutos con PBS-Tween, la membrana se incubó en cámara fría, bajo agitación durante toda la noche con una solución de anticuerpo primario en PBS-Tween, ya sea IgG monoclonal anti pSmad 1/5/8 de conejo (1:250, Cell Signaling Technology #13820), IgG monoclonal de ratón anti Smad1 (1:300, Santa Cruz Biotechnology sc-7965) ó IgG monoclonal de ratón anti GAPDH (1:2000, Santa Cruz Biotechnology sc-32233). Posteriormente, se realizó un lavado de 15 minutos y tres de 5 minutos con PBS-Tween y se incubó la membrana con anticuerpos secundarios ya sea anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano, (1:7000 Jackson ImmunoResearch) ó anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (1:7000 Jackson ImmunoResearch) en solución de PBS-Tween por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó la membrana según procedimiento mencionado anteriormente y para la detección de las proteínas, se incubó la membrana durante 5 minutos con una mezcla 1:1 de sustratos para Inmunotransferencia Luminol y peróxido de hidrógeno del kit ECL Pierce™ Western blotting Substrate (Thermo Scientific™, # 32106). Luego, la membrana se introdujo en un cassette de exposición (Amersham) cubierta con una mica transparente y sobre ella se expuso un film de revelado UltraCruz® Autoradiography Film (Santa Cruz Biotechnology sc-201697) por el tiempo necesario para hacer evidente la presencia de la banda de proteína.

3.10 Ensayo de Inmunocitoquímica

Se realizó un cultivo de células C2C12 en placas de 24 pocillos (Orange Scientific) sobre cubreobjetos de vidrio previamente tratados con radiación UV en cámara de flujo laminar. Las células se trataron con BMP-2 y nicotinamida tal como se ha descrito previamente por 0, 0.5, 2 y 4 horas. Una vez terminados los tratamientos se procedió a lavar los cubreobjetos con PBS 1X frío, un lavado rápido y dos lavados de 8 minutos. Terminados los lavados, las células fueron fijadas con Paraformaldehído al 4% por 30 minutos a temperatura ambiente, y se procedió a los lavados de la forma que se describió anteriormente. En la siguiente etapa se realizó la permeabilización de las células mediante una solución de Tritón X-100 (Sigma) al 0,5% en PBS 1X por 10 minutos a temperatura ambiente, y nuevamente se realizaron los lavados correspondientes. Luego, los sitios inespecíficos se

bloquearon con una solución de albúmina de suero de bovino 1% v/v (BSA; Sigma) en PBS 1X durante 1 hora a temperatura ambiente, tras lo cual las células se incubaron en cámara húmeda con los anticuerpos anti pSmad 1/5/8 de conejo (Cell Signall #13820) en una dilución 1:500 en BSA al 1%, anticuerpo de ratón anti Tubulina (Santa Cruz sc-32293) toda la noche a 4°C. Finalizada esta incubación se procedió a lavar las células como se ha descrito previamente. A continuación se incubaron las células con anticuerpos anti-IgG de ratón conjugado con FITC (Sigma-Aldrich), anticuerpos anti IgG de conejo conjugado con TRICT (Sigma- Aldrich) ambos diluidos en una dilución 1:100 en BSA al 1% junto a una solución de DAPI de (Invitrogen) a una concentración de 0,5 µg/mL. La incubación se llevó a cabo por 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras realizar los lavados con PBS 1X, los cubreobjetos con las células se montaron cuidadosamente en portaobjetos de vidrio utilizando medio de montaje para fluorescencia DAKO (DakoCytomation) y se conservaron a 4°C protegidos de la luz. La observación de las células se llevó a cabo en microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse E600).

3.11 Análisis densitométrico y estadístico

Los resultados que requerían ser cuantificados por densitometría, se analizaron mediante el software ImageJ. Los resultados correspondientes a tres o más experimentos fueron representados con su desviación estándar, y sometidos a un análisis de t-student, el cual se usó para comparar dos grupos. En la mayor parte de los experimentos se comparó en forma individual cada tratamiento con su control específico, y se determinó si existían o no diferencias significativas. El valor $p < 0,05$ fue utilizado para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas. Para la confección de gráficos y análisis estadísticos se utilizó el programa GraphPad Prism 6.

3.12 Preparación de la biblioteca de cDNA y secuenciación RNA-Seq

La calidad del ARN de partida puede influir en el éxito de la secuenciación. Para asegurar una buena calidad del material a utilizar se realizó una electroforesis capilar con el objeto de determinar el estado del ARN por medio del número de integridad del ARN (RIN). Para ello se usó el equipo Tape Station System 2200 (Agilent Technologies) con el kit de reactivo R6K y se seleccionaron aquellas

muestras que tuvieron un RIN igual o superior a 8. Las bibliotecas de cDNA fueron preparadas utilizando 1-4 µg de ARN purificado con poly-A con el kit TruSeq RNA Sample Preparation kit v2 (Illumina®) el cual permite obtener lecturas paired-end (secuenciadas desde ambos extremos, 5´y 3´) de 250 pares de bases utilizando el protocolo proporcionado por el fabricante.

Para realizar la secuenciación RNA-Seq, se utilizó la plataforma de secuenciación Mi-Seq (Illumina®), la cual se basa en amplificación de los fragmentos por método puente.

3.13 Análisis Bioinformático

3.13.1 Pre-procesamiento y filtrado de datos

Los secuenciadores generan grandes cantidades masivas de datos. Inicialmente estos datos son imágenes de microscopía tomadas durante la fase de secuenciación, que posteriormente el propio equipo convierte en archivos de texto plano, estos son los archivos de salida del secuenciador o lecturas crudas en formato Fastq.

La tecnología de secuenciación RNA-Seq se ve obstaculizada por errores en la asignación de bases, cobertura no uniforme, y artefactos de secuenciación específicos de la plataforma. Además la construcción de la biblioteca de cDNA requiere la inclusión de adaptadores los cuales deben ser removidos, ya que no forman parte de las secuencias a analizar. Estas características reducen la calidad de los análisis posteriores y pueden contribuir a una interpretación incorrecta de los datos. Es por ello que se han desarrollado herramientas bioinformáticas para el control de calidad y pre-procesamiento de datos de secuenciación masiva, que permiten remover secuencias de adaptadores u otras secuencias externas y filtrar por la calidad de las lecturas.

Después de obtener las lecturas de secuencias crudas se realizó un pre-procesamiento de remoción de adaptadores y eliminación de lecturas de baja calidad con los programas Fast-QC (www.bioinformatics.babraham.ac.uk) y Trimmomatic (Bolger et al, 2014). La primera herramienta de visualización que se

utilizó Fast-QC proporciona una manera rápida y sencilla de visualizar y verificar la calidad de las lecturas obtenidas de la plataforma de secuenciación Illumina Mi-Seq. Provee una interfaz gráfica con un set de módulos que ayudan a realizar un rápido control de calidad de lecturas como el largo de lecturas, contenido GC, niveles de duplicación, calidad de lecturas en base a Phred, entre otras. Una vez identificados los módulos con parámetros no óptimos, se procedió a utilizar el programa Trimmomatic versión 0.36. Uno de los parámetros más importantes a la hora de analizar secuencias es la calidad, la cual es valorada según la escala Phred o Q, la que se expresa normalmente en código ASCII. Este valor de calidad representa la probabilidad de que una base determinada haya sido erróneamente asignada y se representa por un número entero.

Si P es la probabilidad de error, entonces:

$$P = Q^{-10/10}$$

$$Q = -10 \log_{10}(P)$$

Si el cuartil inferior para cualquier base es menor que 5 o si la mediana para cualquier base es inferior a 20, el módulo se reporta como fallido. Como criterio de selección se utilizaron todas aquellas lecturas con calidad PHRED mayor o igual a 28. Adicionalmente se descartaron secuencias cortas de menos de 50 bases. Para ello se utilizaron los siguientes comandos en la terminal:

```
Java -jar trimmomatic-0.36.jar PE -phred33
CondicionA_S1_L001_R1_001.fastq.gz CondicionA_S1_L001_R2_001.fastq.gz
paired1.fq.gz unpaired1.fq.gz paired2.fq.gz unpaired2.fq.gz LEADING:28
TRAILING:28 MINLEN:50 HEADCROP:10
```

Donde CondicionA_S1_L001_R1_001.fastq.gz es el archivo input con las lecturas en bruto en formato comprimido gz.

PE = Es utilizado para indicar que la operación incluye lecturas Paired-end

LEADING:28 = Con esto se indica que debe descartar lecturas con calidad Phred menor a 28

TRAILING:28 = Indicado para seleccionar solo lecturas con calidad Phred mayor a 28

MINLEN:50 = Si el read es de un largo inferior a 50 bases se descarta

HEADCROP: 10 = Corta 10 nucleótidos desde el extremo izquierdo 5 prima de la lectura.

Para las demás condiciones las lecturas crudas fueron procesadas de manera similar utilizando el mismo programa para filtrar las lecturas.

3.13.2 Alineamiento de secuencias contra genoma de referencia

Cuando existe un genoma de referencia secuenciado para el transcriptoma que se quiere analizar, la reconstrucción de este se puede lograr ordenando las secuencias de lectura sobre este genoma de referencia. Esta estrategia para reconstruir el transcriptoma se denomina alineamiento de secuencias contra referencia o mapeo contra genoma de referencia (Martin & Wang 2011). Se utilizó esta aproximación, debido a que se dispone actualmente del genoma secuenciado de la especie del ratón *Mus musculus* (GRCm38), por lo que fue utilizado como referencia para el alineamiento de lecturas. La secuencia del genoma completo de 2 fue obtenida desde la base de datos Ensembl. Para lograr el alineamiento se utilizó el programa TopHat2 (Kim et al., 2013), el cual está diseñado para alinear secuencias contra grandes genomas de referencia y puede aceptar archivos de entrada en formato FASTQ o FASTA que pueden incluso estar comprimidos. Este programa utiliza Bowtie2 como alineador, el que se ha optimizado para alinear lecturas de un tamaño de 75 pb o superior (Langmead et al., 2009). Adicionalmente, TopHat2 permite el alineamiento de lecturas fragmentadas (Spliced alignment). El funcionamiento del programa de alineamiento TopHat2 se puede describir de la siguiente forma:

- 1) Primer alineamiento de lecturas frente a regiones cuya información de anotación exista y esté disponible en formato GTF ó GFF.
- 2) Las lecturas que no alinean completamente frente al transcriptoma se alinean al genoma, utilizando bowtie2.

3) Las lecturas que no han alineado contra el genoma de referencia son fragmentadas en segmentos menores (25bp por defecto) y mapeadas de nuevo frente al genoma.

En primer lugar se obtuvo la secuencia completa del genoma de *Mus musculus* descargando los ficheros desde la plataforma web <http://www.ensembl.org/>. Una vez descargados los ficheros, se realizó la indexación del genoma de referencia utilizando un esquema basado en la transformada de Burrows-Wheeler que permite la compresión de datos permutando el orden de los caracteres sin cambiar el valor de estos. Para ello se utilizó el programa Bowtie2 (Langmead & Salzberg 2012) de la siguiente manera:

```
$ bowtie2-build -f Mus_musculus.GRCm38.89.gtf
```

En donde la última parte del comando (GRCm38.89) es la base del índice que es usada en los archivos bt2 generados de la indexación.

Enseguida, utilizando TopHat2 se procedió a realizar los alineamientos de lectura contra el genoma de referencia indexado anteriormente. El siguiente comando muestra las condiciones que se utilizaron:

```
$ tophat2 -o result_condicion_B -p 20 --b2-sensitive -G  
/home/alsalas/Documentos/Fernando-  
Rivas/MAPPING_TOPHAT/Mus_musculus.GRCm38.89.gtf  
/home/alsalas/Documentos/Fernando-  
Rivas/Mus_mus.GRCm38_Index/Index.Mus_musculus.GRCm38  
\\*CondicionB1_qual28_MINLEN50_Hcrop10_PoliAT_rm_sorted.fastq  
\\*CondicionB2_qual28_MINLEN50_Hcrop10_PoliAT_rm_sorted.fastq,merged_si  
ngles_reads.fastq
```

-o = Directorio para archivos de salida.

-p = Número de procesadores a utilizar.

--b2-sensitive = opción de mapping en bowtie2, casi el máximo de precisión (más lento).

-G = transcritos conocidos.

El mapeo con las otras lecturas se realizó de la misma forma anteriormente descrita. Tophat2 genera archivos en formato BAM con las lecturas que efectivamente mapearon en el genoma de referencia (mapping_cond_.bam), como también archivos con lecturas no mapeadas (unmapped.bam) junto a un archivo de información (align_summary.txt) que reporta las estadísticas de los alineamientos y la cantidad de lecturas que tuvieron alineamientos múltiples.

3.13.3 Evaluación de calidad del alineamiento de lecturas

La evaluación de la calidad del alineamiento es un parámetro fundamental para determinar la idoneidad para posteriormente, proseguir con los análisis de expresión diferencial. Para ello, se evalúan los archivos de salida de los alineamientos que se crearon en formato BAM.

Los archivos BAM provenientes de la ejecución del alineamiento de lecturas deben ser transformados a otro formato para análisis posteriores, debido a que se encuentran en una versión binaria comprimida. Para ello, primero se realizó un ordenamiento (sorting) de las lecturas mapeadas por coordenadas utilizando la herramienta SAMtools (Li et al., 2009). El proceso de sorting se realizó con el siguiente comando:

```
$ samtools sort mapping_cond_.bam -o mapping_cond_sorted.bam
```

El paso de sorting es requerido posteriormente por visualizadores genómicos y otras herramientas de análisis. Se utilizaron como input los archivos provenientes del mapeo con Tophat2 mapping_cond_.bam, realizando esta operación para todos los archivos de todas las condiciones.

Donde:

sort = realiza un sorting de secuencias BAM de acuerdo a coordenadas cromosómicas.

-o = Para indicar en nombre del archivo de salida (output)

Posteriormente, se realizó una conversión de BAM a formato SAM, el cual es un formato genérico para almacenar alineamientos contra secuencias de referencia. La conversión a este formato se efectuó utilizando el programa SAMtools de la siguiente forma:

```
$ Samtools view -h -o alignments.sam  
Condicion_qual28_MINLEN50_HCROP10_PoliATrm_sorted.fastq
```

Luego, para evaluar la calidad del alineamiento, se utilizó el programa RSeQC que arroja estadísticas de mapping y permite realizar un control de calidad para asegurar que la data tiene una calidad suficiente y apropiada para los análisis subsecuentes (Wang et al., 2012). Se procedió a evaluar algunos de estos parámetros como profundidad de secuenciación, uniformidad de cobertura y distribución de reads.

```
$ bam_stat.py -i mapping_cond_sorted.bam
```

Es importante determinar la uniformidad de cobertura a lo largo de los transcritos, ya que los protocolos en la preparación de la biblioteca de cDNA podrían introducir sesgos que pueden inducir a una desigualdad en el conteo de lecturas ya sea hacia el extremo 5' o 3' de los genes.

Utilizando el programa RseQC y los archivos de anotaciones genómicas en formato BED y los archivos provenientes del alineamiento con TopHat2 como datos de entrada se procedió a calcular la cobertura de reads en el cuerpo del gen utilizando el siguiente comando en python:

```
$ geneBody_coverage.py -r mus_musculusgr38.nochr.bed -i /ruta del  
archivo/mapping_cond_sorted.bam -o coverage_condA_B_C_D -f png
```

Donde:

-r = Es el archivo del genoma de referencia en formato BED

-i = La ruta o el archivo de entrada en formato BAM

-o = Parámetro que permite dar un nombre prefijo a los archivos de salida

El comando anterior produce un gráfico de cobertura en R, el que permite chequear si la cobertura es uniforme a lo largo del transcrito o si existe algún sesgo hacia el extremo 3' ó 5'.

La saturación de profundidad de secuencia permite determinar la confiabilidad del perfil de expresión como también de la construcción de transcritos. Debido a ello, es importante que tan cerca de la saturación están los datos, es decir, poder conocer si nuevos genes o spliced junctions podrían ser descubiertos con una secuenciación adicional. Este parámetro de saturación depende de la complejidad del transcriptoma.

3.13.4 Análisis de Expresión diferencial de transcritos

Una vez realizado el mapeo contra el genoma de referencia, y habiendo verificado que la calidad de los alineamientos es adecuada para las siguientes etapas de análisis, se procedió a realizar el siguiente paso que corresponde al ensamblado y a la cuantificación de la expresión génica. Una vez mapeadas las lecturas en el genoma de referencia de ratón, es necesario generar transcritos a partir de los reads. Para ello se utilizó el programa Cufflinks (Trapnell et al., 2012) el cual ensambla alineamientos de lecturas de RNA en transcritos, calcula las estimaciones de su abundancia y prueba la expresión diferencial. Además posee la ventaja de resolver isoformas. Este programa se ha diseñado para realizar el análisis de expresión diferencial de transcritos mediante el paquete Cuffdiff. El programa Cufflinks toma los alineamientos genómicos en formato BAM y las anotaciones en formato GTF.

```
$ time cufflinks -p 40 -N -G ../GRCm38.89.bye_seleno_2.gtf -b  
../../../../Mus_mus.GRCm38_Index/Index.Mus_musculus.GRCm38.fa -M  
../mask_grcm38_2.gtf -u --compatible-hits-norm  
../../../../FIX_archivos_CondA/result_condicion_A/mapping_cond_A_sorted.bam
```

Donde:

-p = es el número de procesadores utilizados en el proceso

-N =

-G = Parámetro para estimar la expresión de transcritos conocidos

-b = Función que indica corregir por el sesgo de fragmentos

-M =

-u = Valorar lecturas que mapean en múltiples lugares

Los archivos de salida (output) consisten en archivos a nivel de transcritos y genes que contienen valores de FPKM y sus intervalos de confianza. Estos archivos son Genes.fpkm_tracking, Isoforms.fpkm_tracking y Transcripts.gtf

Posteriormente se procedió a ensamblar transcritos provenientes del procedimiento anterior con Cufflinks. Para ello se utilizó el script dentro del paquete de Cufflinks “Cuffmerge”, este permite ensamblar distintos archivos en formato GTF como datos de entrada. Lo anterior se logró utilizando el siguiente comando en la terminal:

```
Ruta/to/cufflinks-2.2.1.Linux_x86_64/cuffmerge -p 30 -o cond_A_B_C_D -g
../GRCm38.89.bye_seleno_2.gtf -s
../Mus_mus.GRCm38_Index/Index.Mus_musculus.GRCm38.fa
transcript_to_merge.txt
```

Donde:

-p = Número de procesadores

-o = Output (archivos de salida)

-g = Guía del genoma de *Mus musculus* anotada en formato GTF

-s = Referencia del Genoma de *Mus musculus* en formato Fasta

Transcrip_to_merge.txt = Archivo que especifica en cada línea los transcritos a unir

El archivo de salida de Cuffmerge es creado en formato GTF, cuyo nombre es **merged.gtf**, el cual contiene el ensamblaje de transcritos que se especificaron en el comando anterior.

Para el análisis de expresión diferencial se utilizó Cuffdiff. Este es un programa que forma parte del paquete de Cufflinks. La ventaja de este programa es que puede

realizar el análisis de expresión diferencial a nivel de gen y de transcritos. El comando utilizado para tal como se muestra a continuación:

```
cuffdiff -o condA_B_C_D_cuffdiff -p 20 -N -b
../Mus_mus.GRCm38_Index/Index.Mus_musculus.GRCm38.fa -u -L
cond_A,cond_B,cond_C,Cond_D -M ../mask_grcm38_2.gtf
../mergeCuff/cond_A_B_C_D/merged.gtf
../FIX_archivos_CondA/result_condicion_A/mapping_cond_A_sorted.bam
../FIX_archivos_CondB/result_condicion_B/mapping_cond_B_sorted.bam
../FIX_archivos_CondC/result_condicion_C/mapping_cond_C_sorted.bam
../FIX_archivos_CondD/result_condicion_D/mapping_cond_D_sorted.bam
```

El archivo de entrada que se utilizó en formato GTF que contiene las anotaciones

Donde -o: Archivo de salida, el cual contiene archivos que pueden ser visualizados

-p: Especifica el número de procesadores utilizados Cuffdiff

-L: Indica lista de marcas que queremos usar para las condiciones

Luego de que el comando ha terminado, se arrojan archivos que contienen información de expresión diferencial. Particularmente el archivo gene_exp.diff contiene la información a nivel de gen, el cual está tabulado e indica, entre otras cosas, si el valor p es significativo. Para la anotación de genes se utilizó el programa Blast2GO y el uso de visualizadores como IGV (Integrative Genomics Viewer) que permite una fácil visualización de datos masivos y exploración interactiva (Thorvaldsdóttir et al., 2013)

CummeRbund es una poderosa herramienta de plotting que provee de funciones para crear gráficos de expresión tipo volcano plot, scatter y box plots. CummeRbund transforma los archivos de salida de Cufflinks en objetos en R, adecuados para el análisis en una amplia variedad de paquetes disponibles dentro del ambiente de R accesibles desde el sitio web de Bioconductor.

3.13.5 Normalización de la data

Posterior a la cuantificación de los niveles de expresión, y para asegurar una comparación exacta de los niveles de expresión entre los distintos tratamientos, la data debe ser normalizada. Para esto, se ajusta el conteo de lecturas por kilobase por millón de lecturas mapeadas. Uno de los métodos de normalización más ampliamente utilizados es el de RPKM/FPKM (Reads Per Kilobase per Million mapped reads), el cual facilita la comparación de los niveles de expresión de transcritos entre las distintas muestras.

El flujo de trabajo de todo el análisis transcriptómico se esquematiza en la figura 7, en donde se indican los pasos en su orden secuencial y los programas y herramientas bioinformáticas utilizadas.

3.13.6 Análisis de enriquecimiento por Ontología génica

La Ontología Génica (Gene Ontology, GO) busca establecer descripciones sólidas de los productos génicos que han sido anotados en diferentes bases de datos, desarrollar y mantener ontologías, anotar los productos génicos, y crear herramientas que permitan mantener y crear las ontologías de manera sencilla. Los términos GO se representan con un nombre, un identificador y una definición haciendo referencia a la fuente de donde se obtuvo. GO congrega tres ontologías distintas: función molecular, proceso biológico, y localización sub-celular (Ashburner et al, 2000).

Para llevar a cabo parte del primer objetivo que se relaciona con determinar las vías de señalización alteradas por efecto de nicotinamida, se realizó un análisis de ontología génica utilizando para ello la plataforma web DAVID (Dennis et al, 2003) y el servidor web REVIGO (Supek et al, 2011). Para la utilización de la herramienta web DAVID de libre acceso se visitó la página <https://david.ncifcrf.gov/>. Los datos de input correspondieron al listado de genes expresados diferencialmente con el ID Entrez_gene y seleccionando el apartado gene list. Adicionalmente se visitó la página del servidor REVIGO <http://revigo.irb.hr/> y se utilizaron las GO ID de cada gen expresado diferencialmente junto con sus valores p y se procedió a seleccionar un valor de similaridad media de 0,7 y se seleccionó la base de datos de UniProt que viene por defecto.

3.14 Validación por qPCR

Para validar la técnica de secuenciación se llevó a cabo una cuantificación de expresión de mensajeros por qPCR de algunos de los genes involucrados en la vía dependiente de Smad. Para ello se utilizaron partidores específicos para los genes, Acvr1 Fmod y Runx2. Para la realización de los qPCR se utilizaró el equipo Real Time PCR System Mx 3000P (Stratagene) con el kit Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific) tal como se indicó previamente. Como control de carga se utilizó el gen Snrpd3, el cual codifica para la subunidad beta del proteosoma.

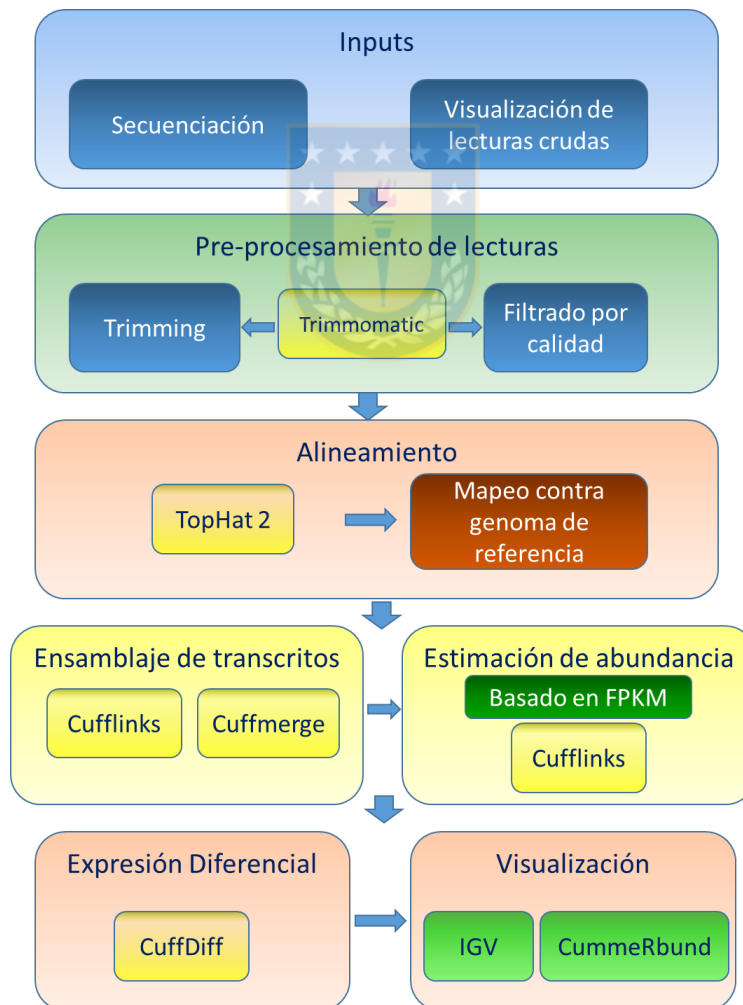


Figura 7. Flujo de trabajo en el análisis transcriptómico: Se muestran los procesos y análisis a realizados desde la obtención de la data cruda (lecturas de secuencia) hasta la

visualización de los resultados de expresión diferencial y se especifican los programas bioinformáticos que se utilizaron para realizar cada tipo de análisis según corresponda. Fuente: Elaboración propia.

4. RESULTADOS

Objetivo 1: “Identificar los genes involucrados en la inhibición de la osteoblastogénesis y las vías de señalización alteradas en respuesta al tratamiento con nicotinamida”

4.1 Determinación del efecto de Nicotinamida sobre la osteoblastogénesis *in vitro*

Con el objeto de poder determinar si nicotinamida inhibe la diferenciación de osteoblastos *in vitro*, se procedió a tratar células C2C12 con nicotinamida a una concentración de 20 mM en presencia o ausencia del factor de crecimiento BMP-2. Previamente, Balint y colaboradores [2003], determinaron que, después de las 16 y 24 post-inducción con BMP-2 se establece el fenotipo óseo en células C2C12. Por consiguiente, utilizamos tiempos de 16, 24 y 48 horas de tratamiento para determinar el posible efecto inhibitorio de nicotinamida sobre el fenotipo óseo. Se puede observar que nicotinamida produce una disminución en la diferenciación de osteoblastos de manera dosis dependiente (**figura 8A, panel superior**). Como se observa en la figura 8, se genera una disminución en la formación de osteoblastos frente al co-tratamiento en comparación con el tratamiento sólo con BMP-2 (**figura 8A, panel inferior**). Como era de esperar, se observa que a las 48 horas en

presencia de BMP-2 existe una mayor cantidad de osteoblastos en comparación al mismo tratamiento a 24 horas.

Estos resultados se ven corroborados por los ensayos de medición de actividad de fosfatasa alcalina (**figura 8B**) en donde se pueden observar diferencias significativas entre los tratamientos con BMP-2 en comparación con el tratamiento nicotinamida+BMP-2 a 24 y 48 horas en ambos tiempos de co-tratamiento, pudo suprimir el efecto de BMP-2 en la inducción de la osteoblastogénesis.

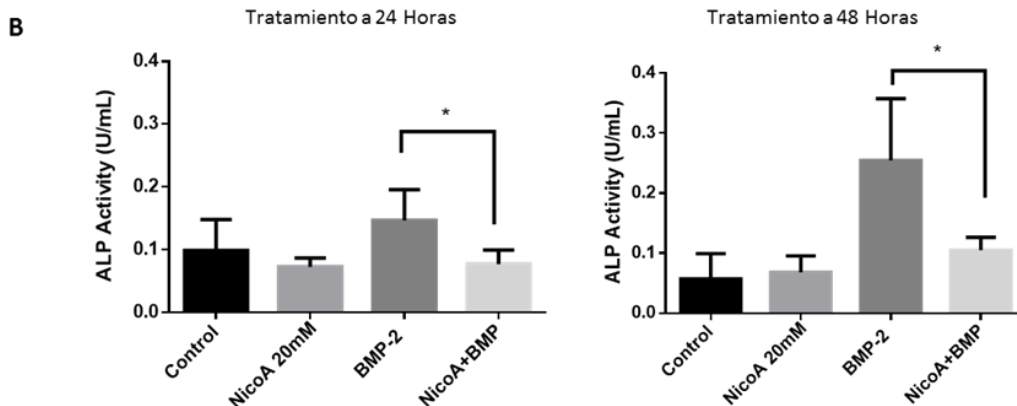
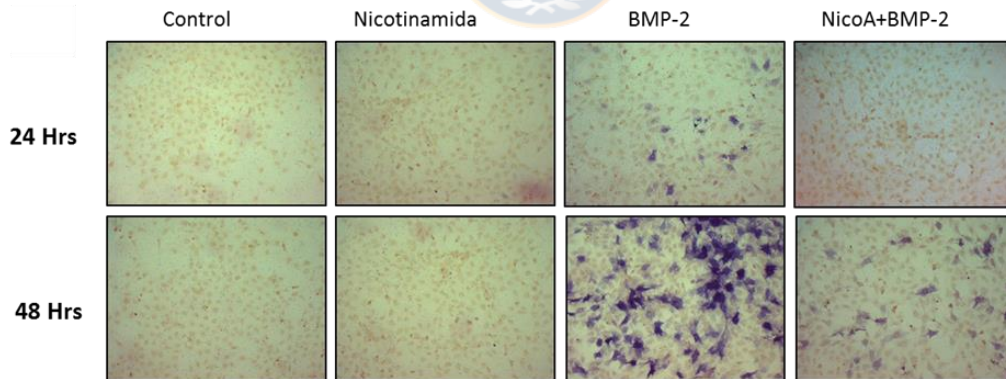
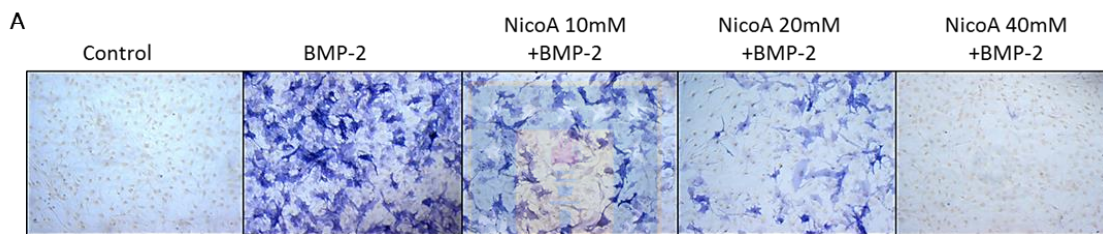


Figura 8. Nicotinamida inhibe la osteoblastogénesis *in vitro* de células C2C12. A: Tinción de osteoblastos mediante Naftol AS-MX para detección de Fosfatasa alcalina. Tratamientos fueron realizados a 24 y 48 horas. **B:** Gráfico de barras que muestra los niveles de actividad de Fosfatasa alcalina. Promedios de desviación estándar para un n=3. Un valor * $p < 0,01$ fue considerado como estadísticamente significativo. Fuente: Elaboración propia.



4.2 Efecto de Nicotinamida sobre expresión de genes en células C2C12 inducidas a diferenciación a osteoblastos

La diferenciación de células C2C12 a osteoblastos es inducida por BMP. Este factor de crecimiento interactúa con el receptor ACVR1, por consiguiente, una probable explicación para el efecto inhibitorio de nicotinamida sobre la osteoblastogénesis es que puede actuar disminuyendo la expresión del gen ACVR1. El receptor ACVR1 (Activin like Receptor 1) es alterado en FOP producto de una variación genética que es responsable de la activación de la vía dependiente de Smad. Con el fin de examinar si nicotinamida produce una disminución en la expresión de este receptor y en otros genes que se expresan en osteoblastos, se realizó un análisis de expresión a nivel de mRNA mediante RT-qPCR para determinar los niveles de expresión de *ACVR1*, *RUNX2* y *FMOD*. Otra probable explicación es que nicotinamida actúe inhibiendo la expresión del factor de transcripción *RUNX2*, el cual regula el proceso de diferenciación osteogénica (Schroeder et al, 2005). BMP-2 es necesario para la activación de Runx2, produciendo la inducción del fenotipo osteoblástico (Phimphilai et al, 2006). En la **figura 9 A** (panel izquierdo) se puede observar que el tratamiento con nicotinamida produce una reducción estadísticamente significativa del mRNA para *ACVR1*, mientras que a las 16 horas el tratamiento sólo con BMP-2 resulta en un aumento de este mRNA. Sin embargo, el co-tratamiento con BMP-2 no produce un cambio estadísticamente significativo en la expresión del mRNA de *ACVR1*. Se puede observar que los niveles de *ACVR1* se mantienen relativamente constantes entre las distintas condiciones después de 24 y 48 horas de tratamiento (**figura 9B y C**, panel izquierdo *ACVR1*). Por otra parte, el tratamiento con BMP-2 produjo un incremento estadísticamente significativo en la expresión de Fibromodulina comparado con el control y el tratamiento con nicotinamida. Sin embargo, el co-tratamiento nicotinamida + BMP-2 no tuvo efecto significativo en la expresión del gen (**Figura 9** panel medio *Fmod*). De manera similar, el factor de transcripción maestro regulador de la diferenciación osteoblástica *RUNX2* incrementó significativamente su expresión luego del tratamiento con BMP-2 a las 24 y 48 horas. Sin embargo, el co-tratamiento con nicotinamida+ BMP-2 no produjo reducción estadísticamente significativa en la expresión de este gen (**Figura 9** panel derecho *Runx2*).

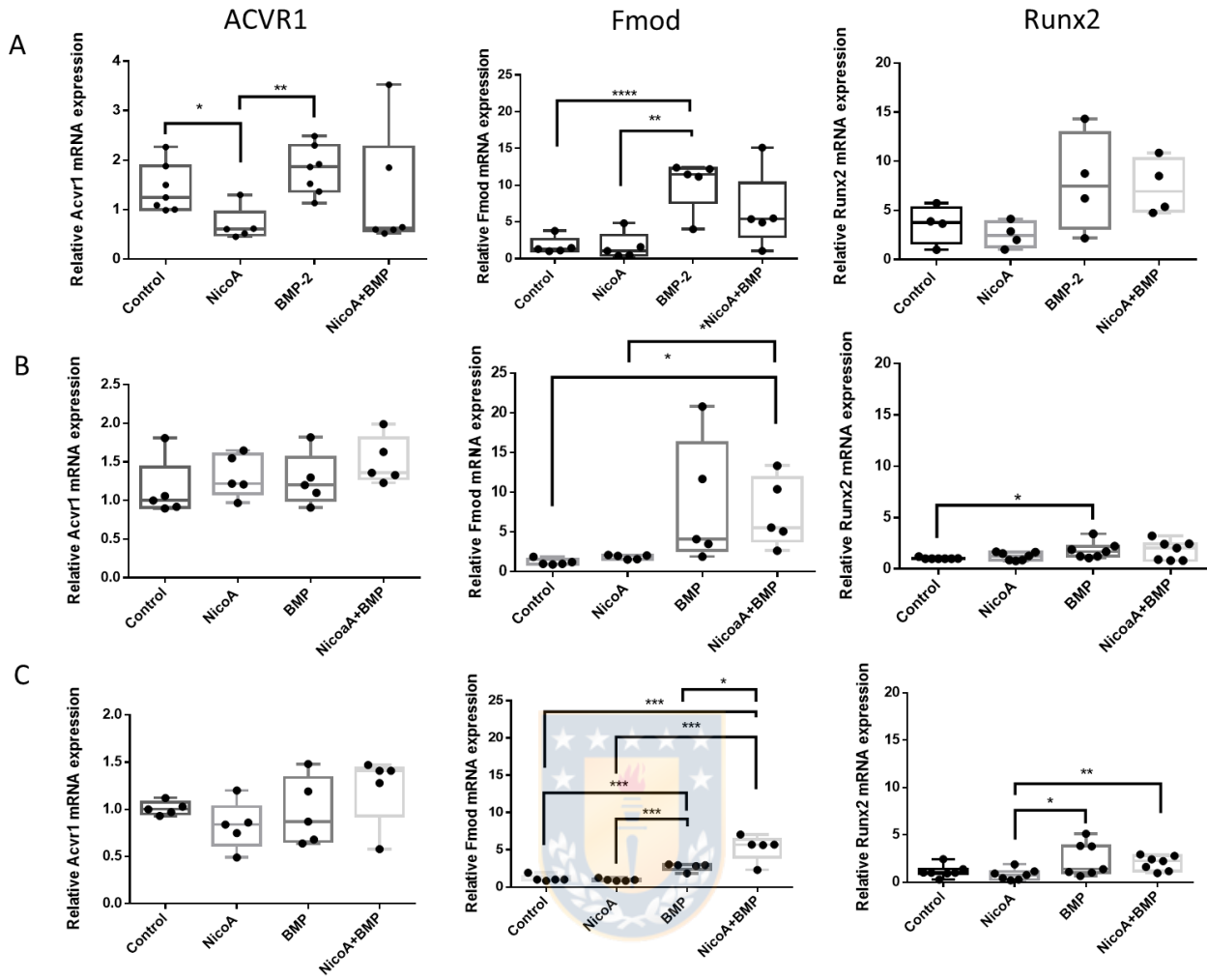


Figura 9. La expresión de los genes *ACVR1* y *RUNX2* es independiente del tratamiento con nicotinamida. Células C2C12 fueron co-tratadas con nicotinamida (20mM) y BMP-2 por 16, 24 y 48 horas. Los gráficos muestran la expresión génica relativa de los mRNA para *ACVR1*, *RUNX2* y *FMOD* luego de 16 horas de tratamiento (panel A), para 24 horas (panel B) y 48 horas (panel C). La cuantificación se realizó mediante RT-qPCR. Un valor * $p < 0.05$ comparado con las células control fue considerado estadísticamente significativo ($n \geq 4$). Fuente: Elaboración propia.

4.3 Efecto de Nicotinamida sobre la fosforilación del complejo Smad 1/5/8 en células sometidas a diferenciación osteoblastogénica

En la patología FOP la hiperactivación de la vía de señalización Smad dependiente de BMP-2 conlleva un incremento en la fosforilación y subsecuente activación del complejo Smad 1/5/8 (Shore et al, 2006). Con el objetivo de determinar el efecto de nicotinamida sobre la fosforilación de este complejo, se examinó mediante inmunoensayo por Western blot y a través de inmunocitoquímica fluorescente los niveles de fosforilación de Smad 1/5/8 lo cual marca el inicio de la activación de la vía osteogénica inducida por BMP-2. La fosforilación del complejo Smad 1/5/8 se puede observar desde las 0,5 horas post-tratamiento. Como es de esperar, a las 0 horas no hay bandas que evidencien la activación de este complejo, sin embargo, desde las 0,5 horas se aprecia una banda marcada en presencia del osteoinductor BMP-2 correspondiente a pSmad, lo que evidencia la activación de la vía osteogénica a través de la fosforilación de este complejo (**figura 10**). Interesantemente, en los tratamientos con nicotinamida, nicotinamida+BMP no se observó una banda de revelado para pSmad 1/5/8 a las 0,5 horas post-tratamiento, situación comparable a lo observado en el control. A las 2 horas post tratamiento con BMP-2, se observa una marcada banda en la condición BMP-2, mientras que en la condición nicotinamida+BMP se aprecia una disminución de la señal de pSmad 1/5/8. Algo similar ocurre a las 4 horas post-tratamiento. En donde se observa un aumento de la fosforilación del complejo Smad 1/5/8 en presencia de BMP-2 comparado con el tratamiento conjunto NicoA+BMP-2. Adicionalmente, se puede observar que no existen cambios en la expresión de Smad 1 en en las distintas condiciones condiciones en estudio.

Por otra parte, el ensayo de inmunotinción por inmunocitoquímica utilizando anticuerpos anti pSmad, reveló que a las 2 horas de tratamiento con BMP-2 existe un aumento significativo en la fosforilación del complejo Smad 1/5/8, el cual se observa en una localización principalmente nuclear. Adicionalmente se puede observar que el co-tratamiento con nicotinamida produjo una atenuación de la señal de fosforilación del complejo (**figura 11**). De manera similar, el mismo efecto se observó para las 4 horas de tratamiento.

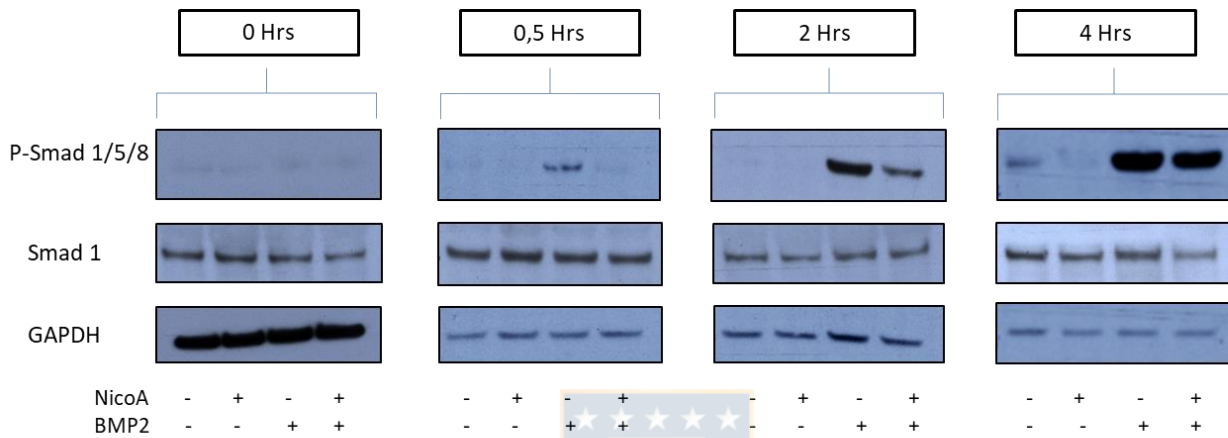


Figura 10. Nicotinamida inhibe la vía de señalización mediada por BMP-2. Células C2C12 fueron cultivadas en presencia de BMP-2 (500ng/mL) en presencia o ausencia de nicotinamida (20 mM) por 0, 0.5, 2 y 4 horas. La activación de la vía de señalización a través de la fosforilación de las proteínas Smad puede ser observada a partir de las 0.5 horas posterior a la exposición con BMP-2. La figura muestra un ensayo de Western blot en donde se observan los niveles de fosforilación del complejo Smad1/5/8, y los niveles de proteína de Smad 1. Como control de carga se utilizó GAPDH (gen de expresión constitutiva). Fuente: Elaboración propia.

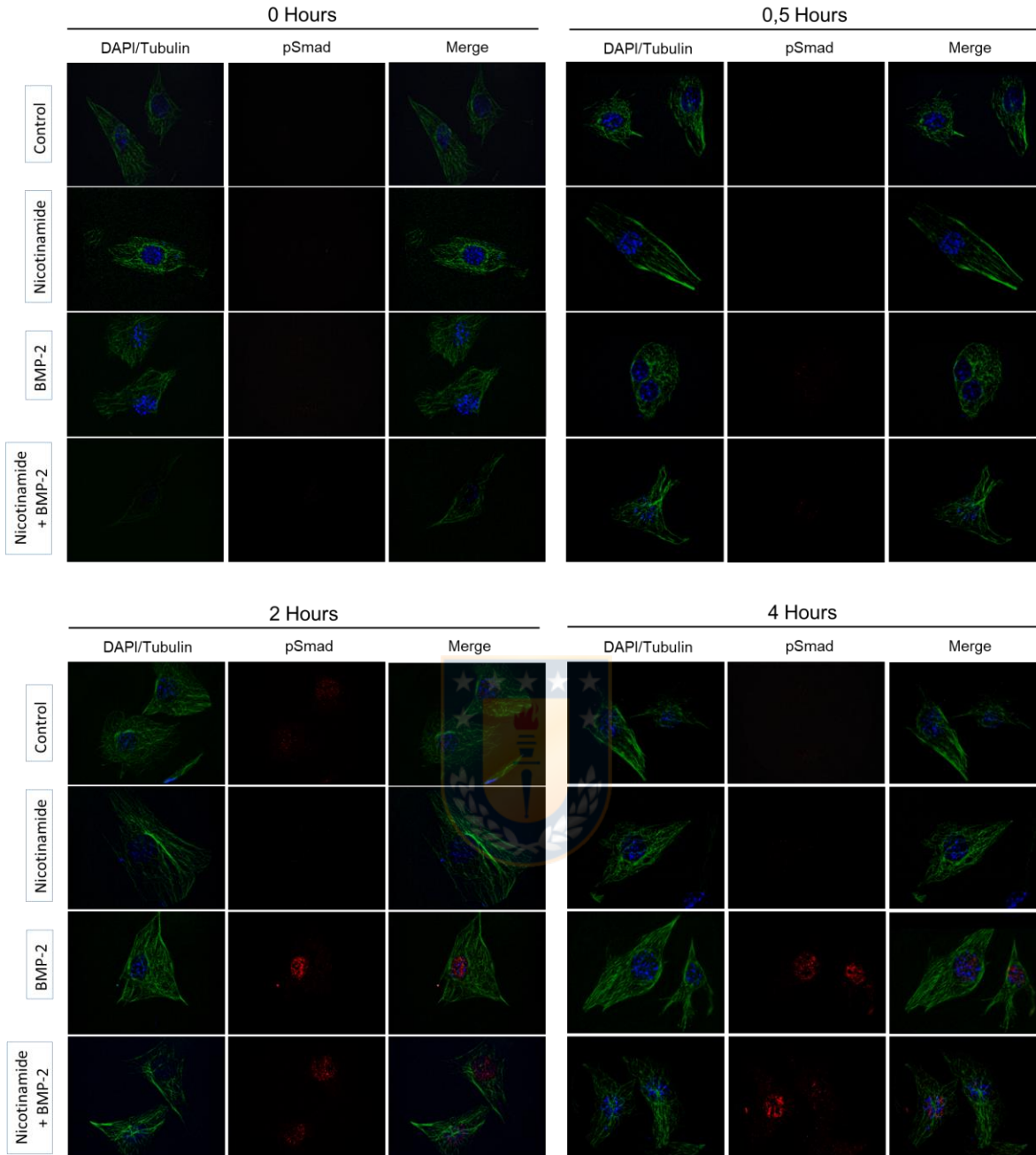


Figura 11. Nicotinamida inhibe la señal de fosforilación del complejo Smad 1/5/8. Células C2C12 fueron cultivadas en presencia de BMP-2 (500ng/mL) en presencia o ausencia de nicotinamida (20 mM) por 0, 0.5, 2 y 4 horas. La figura muestra una Inmunoquímica para el complejo Smad1/5/8 fosforilado (pSmad) marcado con un anticuerpo secundario conjugado con TRITC (rojo), Tubulina fue marcada con anticuerpos secundarios anti mouse conjugados con FITC (verde) y el núcleo fue teñido con DAPI (azul). Las imágenes fueron adquiridas mediante microscopio de epifluorescencia. Fuente: Elaboración propia.

Como se puede apreciar, estos resultados son concordantes con los obtenidos mediante la técnica de Western blot y tomados en conjunto indican que nicotinamida puede disminuir la activación de la vía Smad inducida por BMP-2.

4.4 Perfil de expresión génica mediante análisis transcriptómico

Con el fin de establecer el efecto de nicotinamida sobre la expresión de genes que son clave en proceso de diferenciación osteogénica, se realizó un análisis transcriptómico a través de una secuenciación RNA-Seq. EL primer paso es la extracción de ARN total, el cual fue posteriormente seleccionado con Oligo dT para ser utilizado en qRT-PCR. Para poder medir los niveles de expresión es indispensable contar tanto con una buena cantidad de ARN utilizado como material de partida, como con una buena calidad de ARN. Para ello, se hace necesario evaluar su integridad y determinar que no se encuentre degradado. En la **figura 12** se muestra la electroforesis en donde se aprecian claramente dos bandas correspondientes al ARN ribosomal 28s y 18s (superior e inferior respectivamente) confirmando que el material de partida se encuentra íntegro.

Con el objetivo de cuantificar la integridad de las muestras de ARN, y poder determinar su utilidad para ser secuenciadas, se realizó una electroforesis capilar y posterior análisis con un software de imagen que calcula el número RIN que corresponde a una cuantificación de la integridad del RNA (RNA integrity Number) mediante el equipo AGilent Tape Station System. El número RIN óptimo recomendado para las muestras debe ser igual o mayor a 8.0, indicando que la muestra es adecuada para realizar la secuenciación. Como se observa en la **figura 13**. Todas las muestras junto con sus réplicas experimentales obtuvieron un número RIN mayor a 8.0, lo cual es esencial para una buena calidad en la síntesis de la biblioteca de cDNA.

Posteriormente, se tomaron las muestras y se preparó la biblioteca de cDNA tal como se indica en la sección de materiales y métodos de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

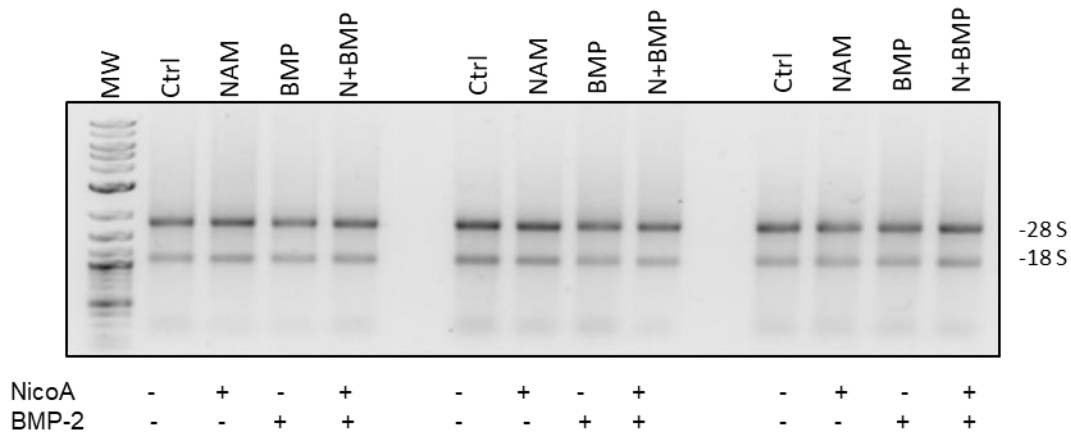


Figura 12. Evaluación de integridad de muestras de ARN. Gel de agarosa al 1% teñido con tinción en gel para ácidos nucleicos (Sybr Safe) donde muestra las bandas de ARN ribosomal (28 S y 18 S), para evaluar integridad del ARN a partir de la cual se realizaron las qRT-PCR. Ctrl: Control, NAM: Nicotinamida, BMP: BMP-2, N+BMP: Nicotinamida+BMP-2.

	Muestra	RIN
A1	Control (1)	9.6
B1	Nicotinamida (1)	8.9
C1	BMP-2 (1)	9.3
D1	BMP+NicoA (1)	9.1
E1	Control (2)	8.7
F1	Nicotinamida (2)	9.2
G1	BMP-2 (2)	8.7
H1	BMP+NicoA (2)	8.9
A2	Control (3)	9.6
B2	Nicotinamida (3)	9.4
C2	BMP-2 (3)	9.3
D2	BMP+NicoA (3)	9.3

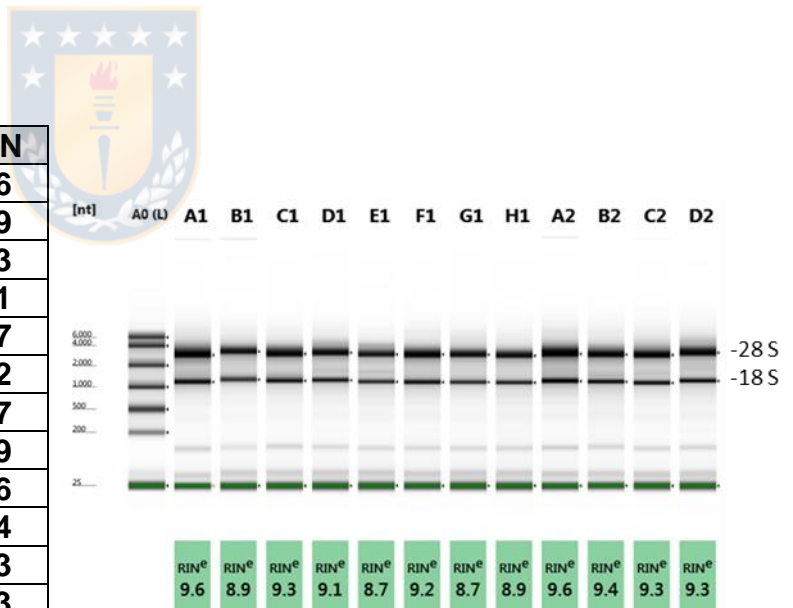


Figura 13. Reporte de calidad de muestras de ARN mediante RNA ScreenTape número RIN. Se cuantificó la integridad del ARN (RIN) mediante electroforesis capilar con el sistema Tape Station System 2200 (Agilent Technologies). El número RIN va de 0 (0% de Integridad ARN) a 10 (100% integridad ARN). Fuente: Elaboración propia.

Una vez sintetizada las bibliotecas de cDNA y debidamente secuenciadas en el equipo MiSeq Illumina, se obtuvieron los datos provenientes del secuenciador el cual arroja lecturas (reads) crudas.

4.5 Visualización y Preprocesamiento de lecturas

Una vez que el equipo MiSeq ha terminado la corrida de secuenciación, se obtienen los datos de secuencias crudas (reads), las cuales deben ser analizadas y determinar su calidad. Para ello, en primer lugar, se visualizaron las lecturas crudas a través del programa FastQC que realiza una serie de análisis identificando módulos o parámetros deficientes en calidad tales como calidad de secuencias en base a número Phred, contenido GC, Distribución del largo de lecturas, secuencias duplicadas, secuencias sobrerrepresentadas, entre otros. Los resultados de la visualización se muestran en la **figura 14**.

El resultado de calidad de las lecturas se ilustra en la **figura 15 A**, en donde se puede apreciar para todas las condiciones el par R2 presenta módulo deficiente en la calidad de secuencia “por base”. Asimismo, se presentan otros módulos deficientes como “contenido de bases por secuencia”, en donde hubo fallas para las muestras control, NicoA y Nico+BMP-2. El módulo “contenido GC por secuencia” solo falló para la condición BMP-2. Por último, el módulo “secuencias sobrerrepresentadas” falló para las condiciones NicoA R1, BMP-2 y Nico+BMP R1.

Una vez identificados los módulos deficientes se procedió a la etapa de pre-procesamiento. El tratamiento de las lecturas en bruto consistió en eliminar secuencias de baja calidad de secuenciación, remoción de secuencias adaptadoras, partidores, filtrado de lecturas cortas y eliminación de secuencias sobrerrepresentadas. El resultado del pre-procesado se ilustra en la **figura 15 B**, en donde es posible observar que ya no existen módulos en rojo (deficientes) y la calidad de las lecturas en general aumentó, por lo tanto, se trabajó con estas muestras pre-procesadas para análisis posteriores.



Figura 14. Visualización de calidad de secuencias crudas. El programa FASTQC permite visualizar de manera rápida y sencilla distintos parámetros de calidad de las lecturas provenientes de una corrida de secuenciación. Aquellos módulos que son adecuados para trabajar se muestran en verde, los que deben revisarse en amarillo y los que no cumplen con el mínimo de calidad se muestran en rojo. Fuente: Elaboración propia.

A

Módulos	Crtl R1	Crtl R2	Nico R1	Nico R2	BMP R1	BMP R2	Nico+BMP R1	Nico+BMP R2
Per base sequence quality	Green	Red	Green	Red	Green	Red	Green	Red
Per sequence quality scores	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
Per base sequence content	Red	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Red	Red
Per sequence GC content	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Red	Red	Yellow	Yellow
Sequence Length Distribution	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
Sequence Duplication Levels	Yellow	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Green	Yellow	Green
Overrepresented sequences	Yellow	Yellow	Red	Yellow	Red	Red	Red	Yellow
Adapter Content	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green

B

Módulos	Crtl R1	Crtl R2	Nico R1	Nico R2	BMP R1	BMP R2	Nico+BMP R1	Nico+BMP R2
Per base sequence quality	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow
Per sequence quality scores	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
Per base sequence content	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
Per sequence GC content	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
Sequence Length Distribution	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
Sequence Duplication Levels	Yellow	Green	Yellow	Green	Green	Green	Yellow	Green
Overrepresented sequences	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow	Green	Green
Adapter Content	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green

Figura 15. Cuadro resumen de módulos de importancia y calidad de lecturas crudas pre y post procesamiento. En la figura se muestran los parámetros más importantes de las lecturas crudas para todas las condiciones secuenciadas desde ambos extremos (paired end) antes del pre-procesamiento (A) y después del pre-procesamiento (B). Aquellos módulos que son adecuados para trabajar se muestran en verde, los que deben revisarse en amarillo y los que no cumplen con el mínimo de calidad se muestran en rojo. Fuente: Elaboración propia.

4.6 Mapeo de lecturas contra genoma de referencia de *Mus musculus*

Una vez realizado el alineamiento de secuencias con el genoma de referencia de *Mus musculus* utilizando el programa TopHat2 se procedió a determinar la calidad del alineamiento de secuencias, mediante análisis con el programa RseQC, el cual permite evaluar distintos parámetros de calidad de alineamiento. Uno de los parámetros evaluados en la calidad de alineamiento de lecturas fue la uniformidad de cobertura de lecturas (reads) en el cuerpo del gen. Esto fue realizado con el paquete bioinformático RseQC que arroja métricas de calidad de los alineamientos, junto con gráficas de fácil interpretación. Lo que hace el programa es calcular el número de lecturas que cubren cada posición nucleotídica a lo largo del gen (Wang et al, 2012). Como se puede observar en la **figura 16 A** la cobertura de lecturas a lo largo del cuerpo del gen desde extremo 5´ a 3´ fue uniforme, no evidenciando sesgos en ninguna región a lo largo del gen. De la estadística de alineamiento general se puede observar que hubo un porcentaje promedio de alineamiento mayor al 70% (**Fig 16 B**). Estos resultados indican que el alineamiento de las lecturas con el genoma de referencia escogido fue uniforme a lo largo del cuerpo del gen, no evidenciando sesgos.

4.7 Análisis de expresión diferencial

El programa Cuffdiff (paquete que forma parte de Cufflinks) produce una serie de archivos de salida, de entre los cuales destaca el archivo llamado gene_exp.diff, el cual se encuentra en formato tabla y aporta información de la expresión génica diferencial indicando si esta expresión es significativa o no. La tabla 3 (superior) presenta un número total de 326 genes expresados diferencialmente lo cual se indica en la última columna con la categoría “yes” como se observa en la tabla 3 (inferior).

Luego se realizó la normalización de la data con el objetivo de que todos los datos entre todas las condiciones sean comparables. Como se puede apreciar de la **figura 17** en el gráfico de cajas, los datos están normalizados y todas las condiciones están al mismo nivel (log10 fpkm), así como las densidades entre las condiciones prácticamente se solapan, de modo que los datos sí son comparables.

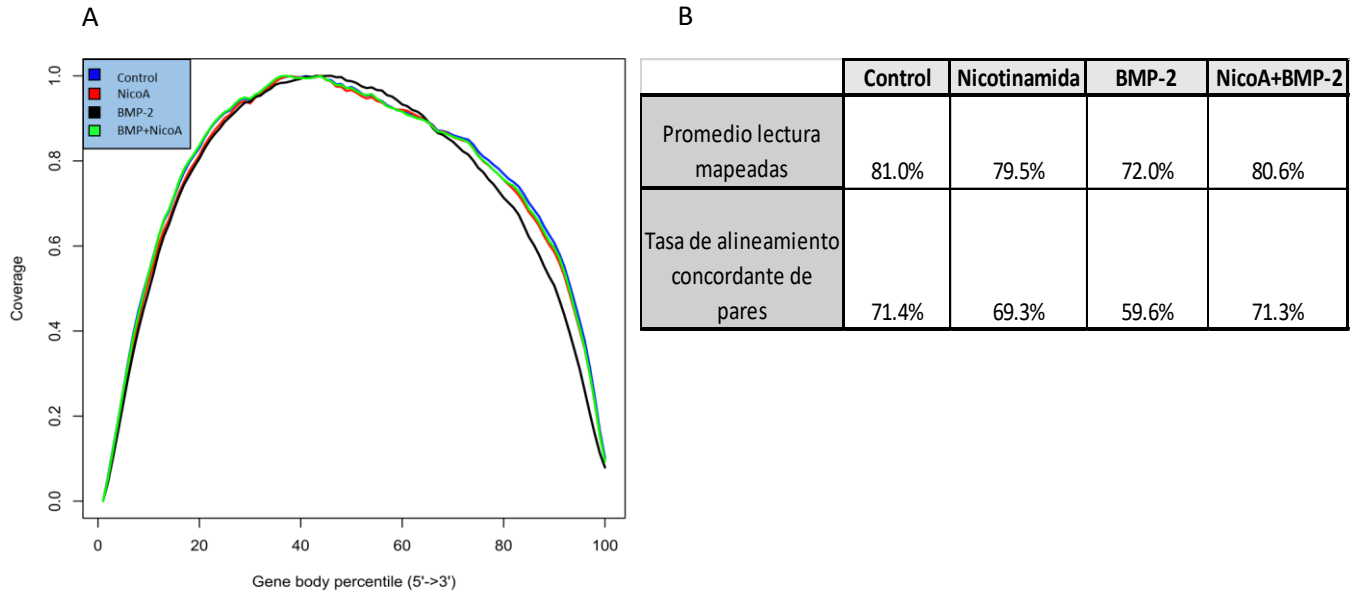


Figura 16. RseqQC plot para uniformidad de cobertura a lo largo de los transcritos. (A) El gráfico muestra para las cuatro condiciones el porcentaje de cobertura desde el extremo 5' hasta el 3'. El largo de todos los transcritos es escalado a 100 nucleótidos. Según el gráfico no se evidencian desviaciones. **(B)** Tabla que muestra el porcentaje de alineamiento general para cada condición según estadísticas de RseqQC. Fuente: Elaboración propia.

TABLA 3. Genes y transcritos expresados de forma diferencial, detectados con cuffdiff.

Columna	Genes expresados diferencialmente	Transcritos expresados diferencialmente
Diferencia significativa	326	186
Diferencia no significativa	299.275	954.769
Total de genes/transcritos expresados diferencialmente	299.598	954.955

Tabla 4. Resumen del análisis de expresión diferencial por Cuffdiff. En la tabla superior se observa la cantidad de genes y transcritos expresados de manera diferencial entre todas las condiciones. Tabla inferior se muestra una fracción de la tabla original proveniente del análisis por Cuffdiff. Para efectos prácticos sólo se muestra una parte de la tabla con los genes y valores de FPKM.

gene_id	gene	sample_1	sample_2	value_1	value_2	log2(fold_ch	p_value	q_value	significant
XLOC_00651	Eno3	cond_A	cond_B	154.582	445.281	-179.559	5,00E-05	0.0140707	yes
XLOC_01563	Enpp2	cond_A	cond_B	379.001	761.984	-231.437	5,00E-05	0.0140707	yes
XLOC_01573	Ly6a	cond_A	cond_B	189.101	469.524	-200.988	5,00E-05	0.0140707	yes
XLOC_02450	Car3	cond_A	cond_B	431.202	919.363	-222.966	5,00E-05	0.0140707	yes
XLOC_02903	Svep1	cond_A	cond_B	453.074	153.064	175.631	5,00E-05	0.0140707	yes
XLOC_03078	Cxcl5	cond_A	cond_B	487.864	180.026	-143.827	0.00025	0.0474778	yes
XLOC_04165	Cx3cl1	cond_A	cond_B	149.459	480.162	168.377	0.0002	0.0407309	yes
XLOC_00035	Tmeff2	cond_A	cond_C	514.142	194.819	192.189	0.00025	0.0474778	yes
XLOC_00108	Fmod	cond_A	cond_C	189.084	130.462	278.653	5,00E-05	0.0140707	yes
XLOC_00120	lvns1abp	cond_A	cond_C	951.521	233.876	-202.449	5,00E-05	0.0140707	yes
XLOC_00209	Stk17b	cond_A	cond_C	743.094	265.766	-148.339	0.00015	0.0322453	yes
XLOC_00226	Igf1bp5	cond_A	cond_C	597.796	880.791	-276.278	5,00E-05	0.0140707	yes
XLOC_00271	Lgr6	cond_A	cond_C	0	913.471	inf	5,00E-05	0.0140707	yes
XLOC_00278	Cfh	cond_A	cond_C	282.795	785.438	-184.819	5,00E-05	0.0140707	yes
XLOC_00312	Grem2	cond_A	cond_C	549.616	241.639	213.636	5,00E-05	0.0140707	yes
XLOC_00350	Ctgf	cond_A	cond_C	207.855	739.359	18.307	5,00E-05	0.0140707	yes
XLOC_00367	Bves	cond_A	cond_C	250.196	777.252	-168.661	0.00015	0.0322453	yes

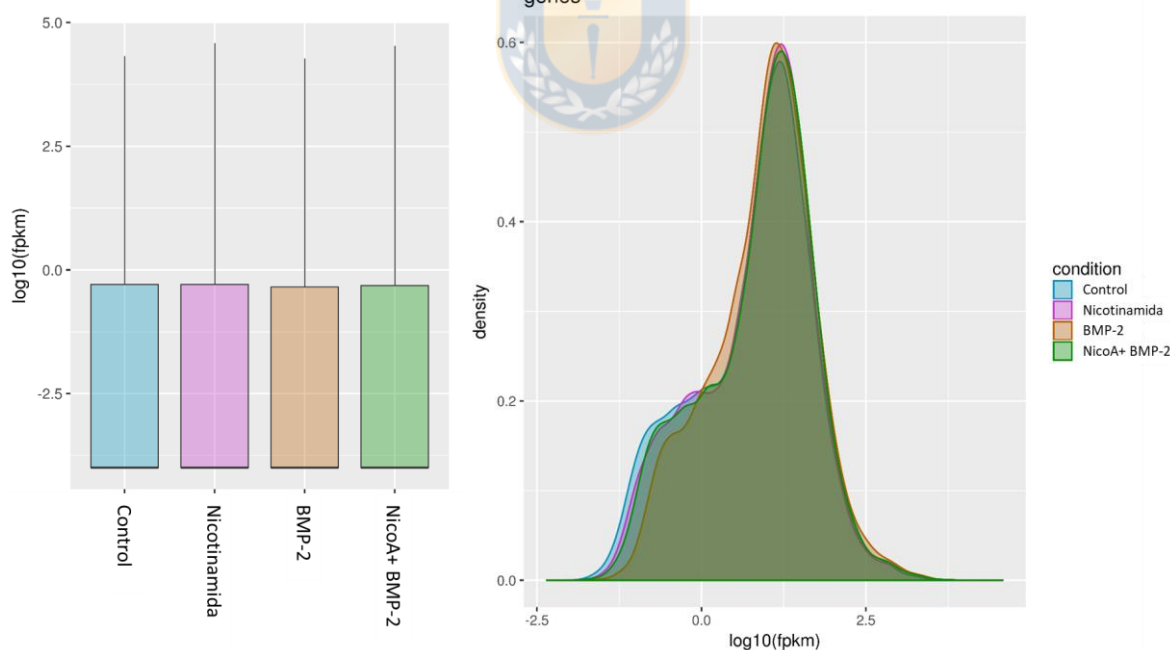


Figura 17. Normalización de la Data. Se observa del gráfico de cajas (izquierda) que todas las condiciones están al mismo nivel una vez normalizadas. El gráfico de densidad (derecha) muestra solapamiento entre las distintas condiciones. Fuente: Elaboración propia.

Otro análisis realizado consistió en visualizar las relaciones entre las distintas condiciones en términos del fold-change de expresión génica y su significancia estadística. Para la visualización de los genes diferencialmente expresados respecto al total de genes se utilizaron los gráficos de tipo Volcano. Como se puede apreciar en la **figura 18**, la comparación entre las distintas condiciones evidencia que existe expresión diferencial de acuerdo al fold-change entre las distintas condiciones estudiadas.

El análisis de componentes principales (PCA) es un método de reducción dimensional multivariante de los datos el que puede ser utilizado para construir representaciones dimensionales de expresión en cada condición (Ringnér, 2008). Consiste en la utilización de un algoritmo matemático que reduce los valores de miles de variables en solo dos componentes (Componente Principal 1 y Componente Principal 2). Esto permite, por ejemplo, establecer relaciones entre las condiciones de estudio además de permitir evidenciar fuentes de variabilidad dentro de la data y junto con ello, evaluar visualmente similitudes y diferencias entre diferentes muestras y determinar si las muestras pueden ser agrupadas (Ringnér, 2008). Otro tipo de análisis útil es la confección de dendrogramas, que pueden proveer información sobre las relaciones entre distintas condiciones utilizando set de datos de expresión diferencial. Sólo los genes cuya expresión es estadísticamente significativa son utilizados para representar la relación existente entre condiciones.

En la **figura 19 A** (izquierda) observamos el análisis de conglomerados a través de un dendrograma, en donde se aprecia claramente que hay diferencias entre los distintos grupos en estudio. Adicionalmente, se puede ver que los tratamientos control y nicotinamida forman un cluster con los elementos más similares entre sí, el tratamiento nicotinamida+ BMP-2 se establece como grupo con elementos semejantes al cluster nicotinamida-control. Por otra parte, el tratamiento solo con BMP-2 forma un cluster aislado, y distanciado del control y nicotinamida lo que evidencia que sus elementos son los más disímiles comparados con las otras condiciones en estudio. Similarmente, esto es apoyado por el análisis de componentes principales (PCA) (**Figura 19 B, derecha**) en donde se observa en

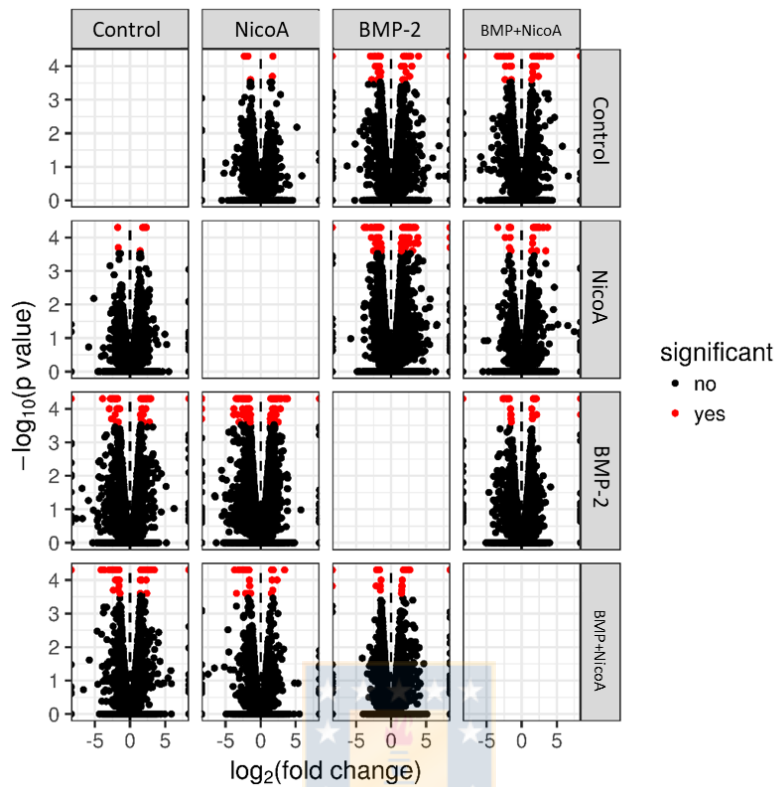


Figura 18. Expresión génica diferencial entre distintas condiciones en estudio.

El gráfico muestra las relaciones comparativas de expresión diferencial entre distintas condiciones. Los genes expresados de manera estadísticamente significativa se representan como puntos rojos. En puntos negros se representan los genes expresados de manera no significativa. Fuente: Elaboración propia.

primer lugar que no hay intersección entre las diferentes condiciones, por lo que se establecen en grupos bien diferenciados. En particular se puede observar que la condición BMP-2 forma un grupo bien diferenciado del resto de las condiciones en el componente principal 2 y en donde es evidente la formación de un agrupamiento constituido por las condiciones control, nicotinamida y nicotinamida+BMP-2.

Estos resultados en conjunto indican que el co-tratamiento NicoA+BMP-2 en sus componentes de expresión génica se asemeja más al control y al tratamiento con nicotinamida que al tratamiento sólo con BMP-2.

4.8 Análisis de expresión diferencial mediante gráfico tipo HeatMap

El Heat map (mapa de calor) es un tipo de visualización que muestra los valores de expresión de los genes usando una escala de colores (**Figura 20**). En el Heatmap A se observan todos los genes que arrojaron una expresión diferencial entre todo el conjunto de condiciones. En el Heatmap B, se muestran los 72 genes diferencialmente expresados entre la condición Control vs BMP-2, muchos de los cuales están relacionados con el proceso de formación osteogénica. El Heatmap C, muestra los 28 genes diferencialmente expresados entre la condición BMP-2 y la condición NicoA+BMP-2. La tabla 4 muestra el listado de genes cuya expresión fue estadísticamente significativa para las condiciones mencionadas. El listado de todos los genes diferencialmente expresados, se utilizó como material de entrada (input) para el análisis de Ontología génica.

4.9 Ontología génica y análisis de rutas moleculares enriquecidas

Con el objetivo de determinar los procesos y rutas moleculares que se ven alteradas por el tratamiento con nicotinamida, se llevó a cabo un análisis de Ontología génica (Gene Ontology). La Ontología de Genes comprende una representación computacional de cómo los genes codifican funciones biológicas a nivel molecular, celular y tisular. Congrega tres ontologías distintas, las cuales establecen distinta relación con tres aspectos de la biología celular, estas son: función molecular, proceso biológico, y localización sub-celular.

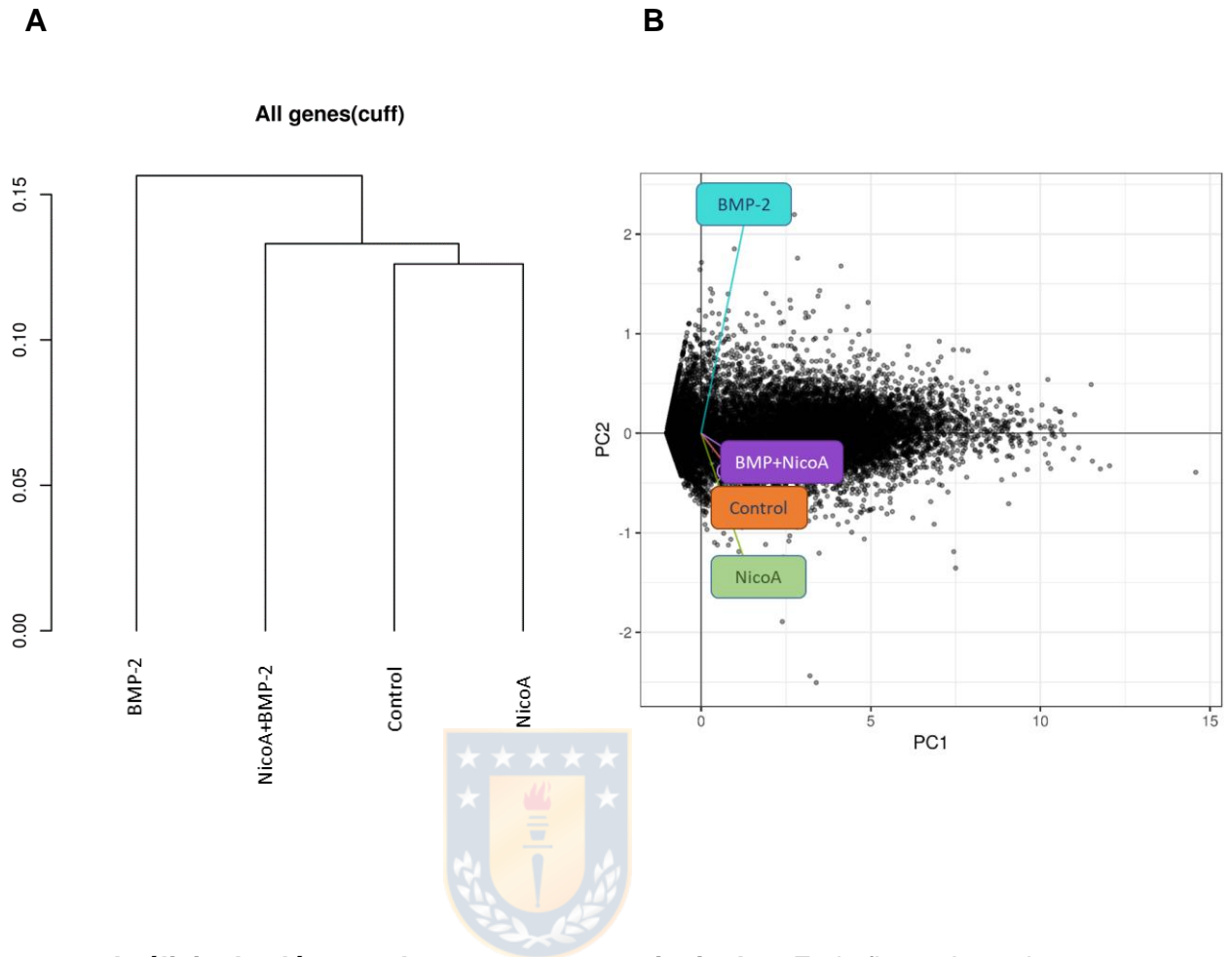
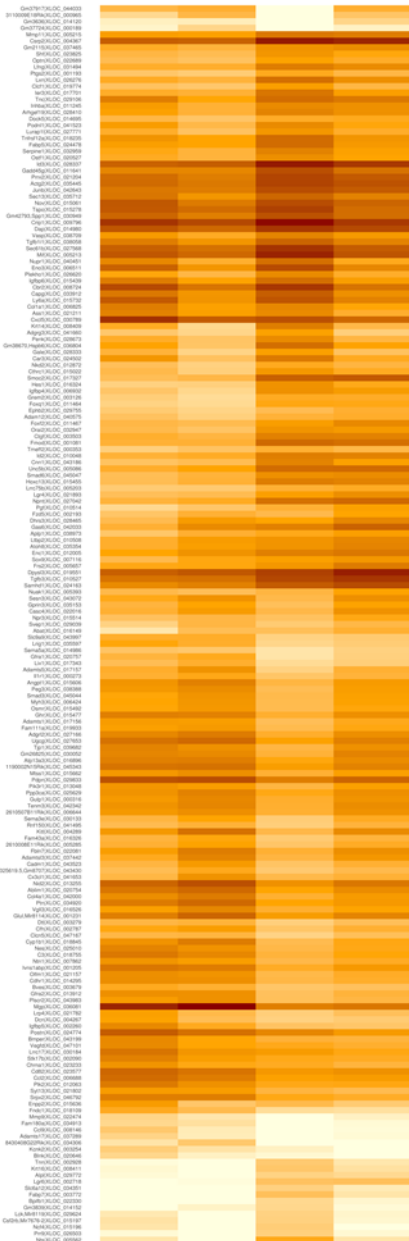


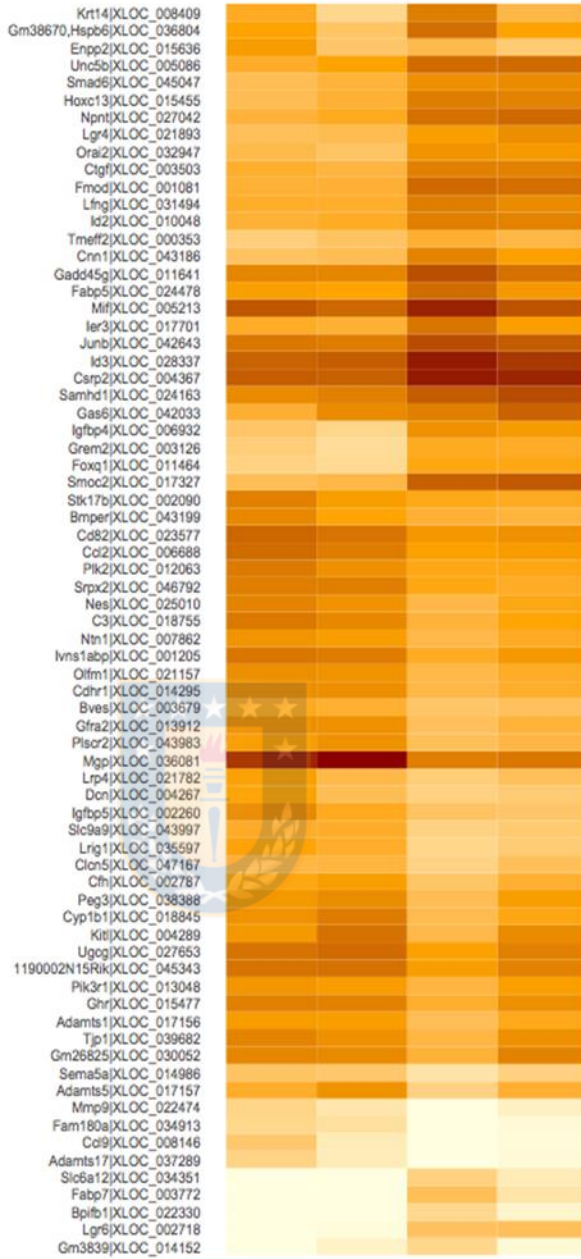
Figura 19. Análisis de clúster y de componentes principales. En la figura A se observa un dendrograma para las cuatro condiciones de estudio. En la figura B, se representa un gráfico proveniente de un análisis de componentes principales. Los gráficos fueron realizados con el programa CumeRbund. Fuente: Elaboración propia.

A

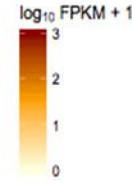


Control Nico A BMP-2 NA+BMP

B



Control Nico A BMP-2 NA+BMP



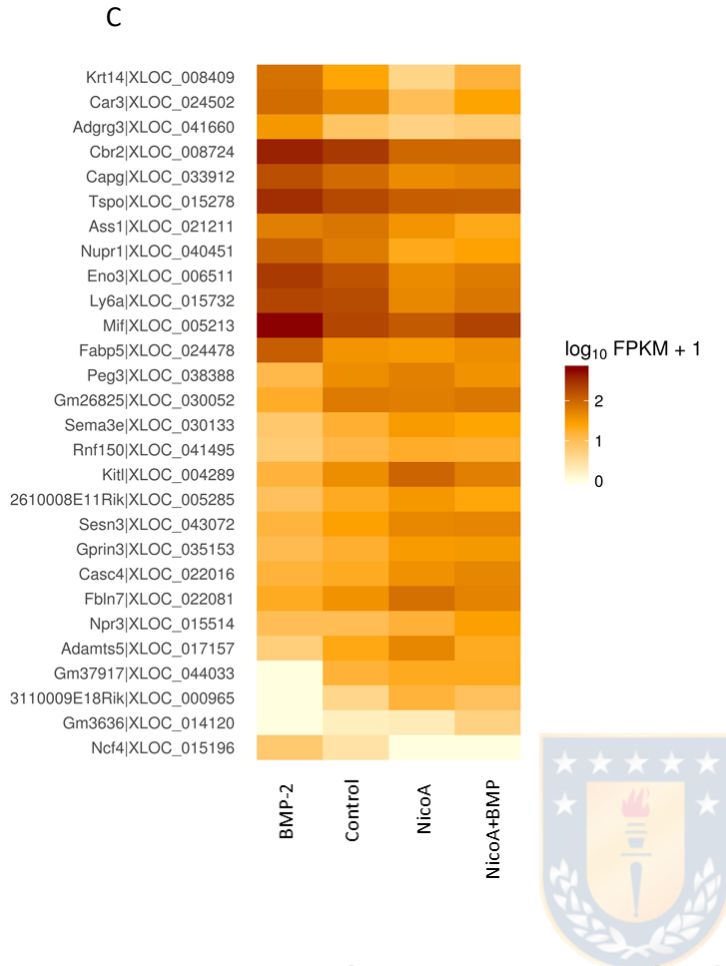


Figura 20. Visualización de perfil de expresión génica a través de Heatmap. El heatmap en A muestra todos los genes diferencialmente expresados entre todas las condiciones. En B, el heatmap muestra los genes diferencialmente expresados entre la condición Control vs BMP-2. En la figura C se muestra un gráfico tipo Heat map en donde se observa la expresión de 28 genes que se encuentran diferencialmente expresados entre condición BMP-2 y condición nicoA+BMP-2. La barra de color refleja el nivel de expresión génica (\log_{10} FPKM) desde blanco (baja) a rojo (alta). Fuente: Elaboración propia.

Tabla 5. Genes diferencialmente expresados entre condición BMP-2 vs NicoA+BMP-2.

Genes diferencialmente expresados BMP-2 vs NicoA+BMP-2			
3110009E18R	Adamts5	Peg3	Gm3636
Kitl	Ass1	Nupr1	Ncf4
Mif	Casc4	Rnf150	Tspo
2610008E11R	Fbln7	Adgrg3	Sema3e
Eno3	Fabp5	Sesn3	Npr3
Krt14	Car3	Gm37917	Gprin3
Cbr2	Gm26825	Capg	Ly6a

Este análisis de enriquecimiento funcional busca conocer en qué procesos se encuentran involucrados los genes que evidencian una expresión génica diferencial, y qué características presentan en común.

Del análisis de Ontología génica, se pudo observar que BMP-2 induce la activación de procesos biológicos vinculados estrechamente con la formación de hueso y cartílago. Esto se puede evidenciar, de los términos con mayor representación, como se muestra en la **figura 21 A**, en donde se pueden resaltar los términos “Desarrollo de cartílago involucrado en la morfogénesis de hueso endocondral”, “Secuestro de BMP del receptor vía unión a BMP”, “Proliferación de condrocitos”, “Proliferación de osteoblastos”, “Regeneración ósea” entre otros. La representación de estos procesos concuerda ampliamente con la función descrita para BMP-2 como osteoinductor (Beederman et al, 2013; Urist M, 1997; Wu et al, 2016). Por otra parte, al analizar los términos mayormente representados en la condición NicoA+BMP-2, se puede observar que los procesos relacionados con la condrogenesis y la osteogenesis ya no son los mas representativos, indicando que nicotinamida inhibe la activación de los procesos celulares anteriormente señalados (**Figura 21 B**). En este sentido, se pueden resaltar términos como “Respuesta a vitamina B1”, “Respuesta inflamatoria”, lo cual era de esperar debido al efecto ampliamente conocido de nicotinamida como un potente anti-inflamatorio (Ungerstedt et al, 2003). Adicionalmente, se pueden observar otros procesos regulados por nicotinamida como “Regulación de la proliferación de osteoblastos” y “Regulación negativa de la vía NIK/NF-kappaB”. Esto ultimo es interesante, debido a que se ha demostrado un rol importante de NF-kappaB en la inhibición de la diferenciación osteoblastogénica (Eliseev et al, 2006).

Posteriormente se llevó a cabo un análisis de rutas moleculares enriquecidas a través de la plataforma web DAVID con la base de datos de KEGG utilizando para ello la lista de genes diferencialmente expresados con su correspondiente ID GO, el cual fue obtenido desde la plataforma BIOMART (<https://www.ensembl.org/biomart/martview/>). Como se puede apreciar en la **figura 22**, panel superior, una de las vías alteradas por nicotinamida es la vía de señalización PPAR, en donde se ve involucrado el acido 9-cis Retinoico, cuyo rol

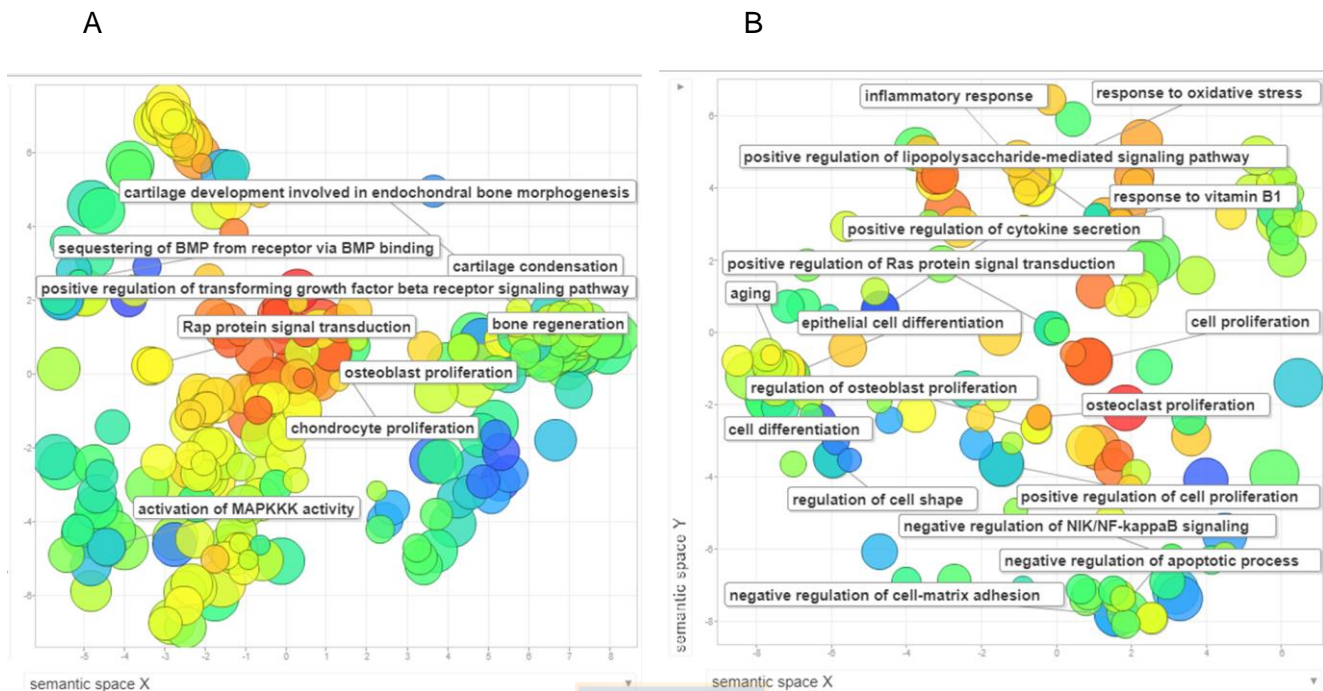


Figura 21. Procesos Biológicos representados. El gráfico tipo Scatterplot muestra los cluster de terminos mas representativos. En A se muestra el resultado de analisis de procesos biológicos representados en las muestras tratadas con BMP-2. En la figura B, se observan los distintos procesos biológicos representados para las muestras cotratadas con nicotinamida+BMP-2. Se utilizó la plataforma bioinformática web ReviGO. El tamaño de las burbujas indica la frecuencia de un termino de Ontología génica (GO). Fuente: Elaboración propia.

en la osteogénesis es controversial, debido a que se han reportado funciones tanto potenciadoras como inhibidoras de la diferenciación osteogénica (Wang et al, 2008). Adicionalmente, una de las rutas alteradas por el tratamiento con nicotinamida es la vía de NF-kappaB (**Figura 22**, panel inferior). Se ha descrito que esta vía juega un rol crítico en la respuesta inmuno-inflamatoria (Ghosh, 2002) lo cual concuerda con el hecho de que nicotinamida posee amplios efectos anti-inflamatorios. Por otra parte, se observa que el factor de transcripción NF-kappaB está directamente relacionado con Sirt1 como se aprecia en la ruta molecular indicada.



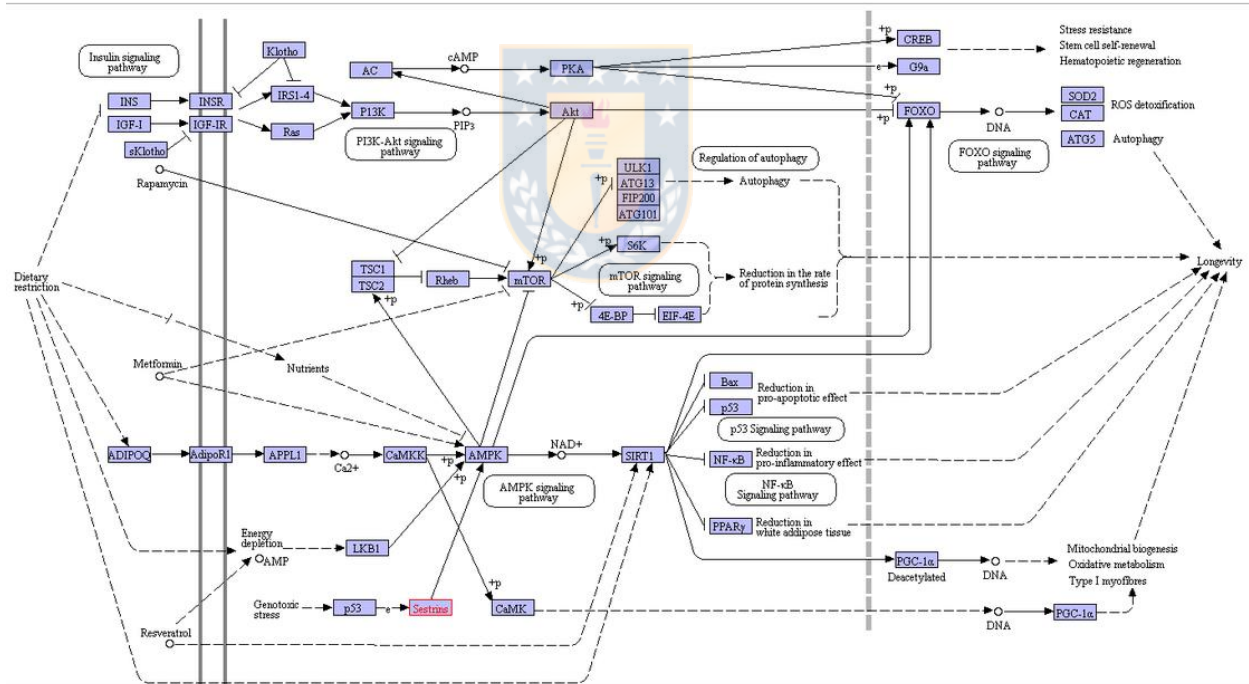
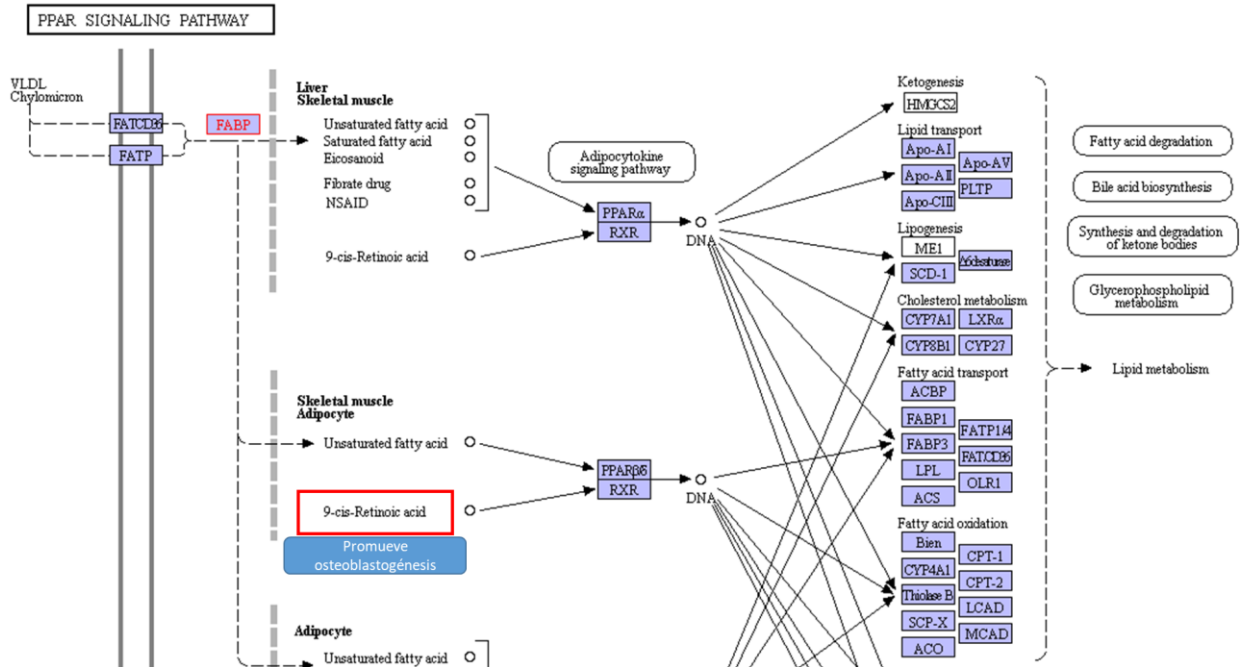


Figura 22. Análisis de rutas moleculares enriquecidas. Se observan las principales vías de señalización afectadas por el tratamiento con nicotinamida+BMP. La información fue obtenida desde la base de datos del KEEG. Fuente: Elaboración propia.

DISCUSION

El proceso de diferenciación osteogénica comienza cuando el factor de crecimiento BMP-2 se une a dos receptores serino-treonino quinasas tipo I (ACVR1) y tipo II (BMPRII) formando un complejo oligomérico y produciendo su dimerización. Primero, BMP-2 es reconocido por el receptor de tipo II, el cual produce la fosforilación del receptor de tipo I y consecuentemente se activa. Una vez activado el receptor de BMP tipo I, gatilla una cascada de señalización intracelular que produce la fosforilación de las proteínas Smad 1/5/8, las que una vez activadas forman complejo asociándose con Smad 4 (Hassel et al, 2003). El complejo formado por las proteínas Smad transloca desde el citoplasma hacia el núcleo celular y activa la transcripción del gen *RUNX2*, el cual es el regulador maestro que inicia la activación de la expresión de otros genes específicos en el proceso de diferenciación hacia osteoblastos, favoreciendo la diferenciación y la subsecuente síntesis de la matriz ósea (Phinphilai et al, 2006).

La desregulación de la vía de señalización mediada por BMP juega un rol fundamental en el proceso de la osificación heterotópica, y es la vía de señalización intracelular más estudiada asociada con esta condición patológica, aunque existen otras vías involucradas que también pueden contribuir a la formación de hueso ectópico (Kan et al, 2017).

Se ha estudiado el efecto de diversos compuestos farmacológicos sobre la Osificación heterotópica actuando a distintos niveles de la vía de señalización Smad. Este estudio se centró en la utilización de nicotinamida ya que se ha reportado que en pacientes con FOP, produce una mejora en su condición, específicamente genera un retraso en la aparición de brotes de osificación, junto a una disminución importante de los focos inflamatorios (Quevedo & Díaz, 2014).

En el presente trabajo de estudio, se encontró que nicotinamida inhibe la diferenciación de células C2C12 pre-mioblásticas hacia osteoblastos en una manera dosis y tiempo-dependiente como se puede apreciar de los ensayos de diferenciación celular y tinción de osteoblastos (Figura 8). Estos resultados concuerdan con los experimentos realizados por Bäckesjö y colaboradores, en los

cuales cultivaron células madre mesenquimales en presencia de nicotinamida, observando una disminución en la diferenciación osteogénica además de una disminución en la mineralización. Adicionalmente, ha sido reportado que la adición de nicotinamida a células madre mesenquimales provenientes de ratón produjo una disminución en la expresión de marcadores de osteoblastos tales como, colágeno 1alfa-1, osteocalcina, *RUNX2*, con un marcado descenso en la expresión de fosfatasa alcalina *ALP* (Bäckesjö et al, 2006). De igual manera, el ensayo de actividad enzimática de la fosfatasa alcalina apoya los resultados de la tinción de osteoblastos, en donde se observa que BMP-2 induce una fuerte actividad enzimática, en comparación con el co-tratamiento BMP+nicotinamida, en donde se observó una disminución estadísticamente significativa de la actividad enzimática, contrarrestando de esta manera el efecto osteoinductor de BMP-2. En conjunto estos resultados indican que nicotinamida tiene la capacidad de inhibir la formación de osteoblastos (Figura 8).

Por otra parte, la expresión del factor de transcripción *RUNX2*, el cual se ha descrito como regulador maestro de osteoblastogénesis, no se ve afectada a 16 horas de tratamiento, sin embargo, se pudo evidenciar un aumento significativo de la expresión tanto a las 24 como a las 48 horas post inducción con BMP-2 (Figura 9, panel derecho). De manera similar, tampoco se pudo evidenciar una disminución de la expresión del receptor *ACVR1* (Figura 9, Panel izquierdo), por lo que la inhibición de la formación de osteoblastos mediada por nicotinamida es independiente de *RUNX2* y de *ACVR1*. Estos resultados sugieren la participación de otros productos génicos no involucrados directamente con la vía Smad dependiente de BMP. Según diversas investigaciones en cuanto a los efectores de nicotinamida, se puede indicar la posible participación de una proteína deacetilasa llamada Sirt1 que no está directamente relacionada con la vía Smad. Sirt1 es una enzima deacetilasa NAD⁺ dependiente que es fuertemente inhibida por nicotinamida (Bitterman et al, 2002). Esta enzima actúa transfiriendo grupos acetilos a sus blancos proteicos que incluyen histonas y factores de transcripción (Blander & Guarente 2004). Se ha descrito que Sirt1 es un regulador positivo en la formación de masa ósea. Así por ejemplo se ha demostrado que en ratones haploinsuficientes (*Sirt1^{-/+}*) ocurre una reducción

significativa de la masa ósea acompañada de una disminución en la formación de hueso. Adicionalmente, en estos estudios hubo una disminución significativa de la actividad de fosfatasa alcalina en células mesenquimales y una disminución estadísticamente significativa en la expresión de genes marcadores como Colágeno1 alfa-1, Osteocalcina y Sialoproteína ósea (Cohen-Kfir et al, 2011). Otros investigadores muy recientemente han demostrado que Sirt1 ejerce un efecto modulador positivo sobre el factor de transcripción Runx2 (Zainabadi et al, 2017), el cual es un factor indispensable para la diferenciación a osteoblastos durante el proceso de formación ósea, tanto en la osificación endocondral como intramembranosa (Long 2012).

Recientemente un grupo de investigadores, utilizando ratones como modelo de estudios generaron una mutación en el exón 4 de Sirt1 que corresponde a la secuencia que codifica para el sitio catalítico de la enzima. Observaron una disminución tanto en marcadores de diferenciación a osteoblastos como de mineralización, evidenciando una reducción significativa de la actividad de fosfatasa alcalina, junto con una reducción en los niveles de expresión de Osteocalcina, Osteopontina y Sialoproteína Ósea (Zainabadi et al, 2017). Adicionalmente utilizando vectores con el gen reportero luciferasa para determinar la actividad transcripcional de Runx2, los investigadores observaron que la sobre-expresión de Sirt1 incrementó significativamente la actividad del gen reportero, mientras que, por otra parte, el silenciamiento de Sirt1 mediante ARN de interferencia provocó una disminución de la actividad de luciferasa. Esto indica que Sirt1 es un regulador positivo del factor maestro de la osteoblastogénesis Runx2 (Zainabadi et al, 2017). El mismo grupo de investigadores en otro artículo publicado, demostró el rol de Sirt1 como regulador positivo de la masa ósea *in vivo*. Ratones knockout para Sirt1 presentaron una significativa reducción en la masa ósea que se acrecienta con el trascurso del tiempo. Por otra parte, utilizando SRT1720 un agonista de Sirt1, se evidenció un aumento estadísticamente significativo de la masa ósea en tibia, fémur y espina dorsal (Zainabadi et al, 2017b).

Otro estudio mostró que, en células mesenquimales tratadas con Resveratrol, un activador de Sirt1, la interacción entre Sirt1 y Runx2 se potenciaba y que esta

interacción disminuye cuando las células son tratadas a concentraciones de nicotinamida de 10 y 100 mM. Adicionalmente utilizando un oligonucleótido anti-sense para Sirt1 junto a nicotinamida se produjo un aumento en el estado de acetilación de Runx2 y una disminución abrupta a nivel de proteína de Osteocalcina, uno de los genes blanco de Runx2 (Shakibaei et al, 2012) indicando que un aumento de la acetilación de Runx2 producto de la inhibición de Sirt1 podría disminuir la actividad transcripcional del factor de transcripción y por consiguiente inhibir la diferenciación a osteoblastos. Con todo lo anterior, el efecto en la reducción de la diferenciación de células mesenquimales a osteoblastos puede ocurrir a través de un mecanismo que involucra a Sirt1, el cual modula positivamente la actividad transcripcional del factor de transcripción Runx2 (Zainabadi et al, 2017)

Con respecto al efecto de nicotinamida en la fosforilación del complejo Smad1/5/8 dependiente de la vía BMP debemos destacar que este es el primer trabajo que determina la disminución de la activación de la vía de señalización dependiente de BMP (Figura 10). Cabe mencionar que existen muy pocas investigaciones que han relacionado este efecto inhibitorio de nicotinamida en las primeras etapas de activación del complejo Smad.

Se ha demostrado mediante ensayos de Co-Inmunoprecipitación y GST-Pulldown que Sirt1 interacciona con Smad7, un inhibidor de la vía Smad dependiente de BMP (Miyazawa & Miyazono 2017) y que esta interacción ocurre tanto en un contexto *in vivo* como *in vitro* en la región N-terminal de Smad7. Esta interacción resulta en la desacetilación de residuos de Lisina que protegen a Smad 7 de la ubiquitinación y posterior degradación vía proteosoma (Kume et al, 2007). Adicionalmente se determinó que los niveles de expresión proteica de Smad7 fueron significativamente disminuidos en células mesangiales derivadas de ratón que sobre-expresaban Sirt1 y por otra parte, los niveles proteicos de Smad7 incrementaron frente al silenciamiento de Sirt1 (Kume et al, 2007). De esta forma se establece a Sirt1 como un modulador negativo de Smad7.

El efecto general inhibitorio de nicotinamida sobre la diferenciación osteogénica ocurre a través de un mecanismo que involucra la disminución de la activación de

la vía Smad dependiente de BMP-2. Con todo lo anterior, se plantea entonces un probable mecanismo de inhibición que involucra a nicotinamida como inhibidor de Sirt1, el que a su vez regula negativamente a Smad7, produciendo una disminución en los niveles de fosforilación del complejo Smad 1/5/8. Sin embargo se requieren más estudios para determinar el mecanismo molecular preciso por el cual nicotinamida previene la diferenciación *in vitro* de células mesenquimales a osteoblastos mediante la inhibición de la activación de la vía Smad dependiente de BMP.

Con respecto al análisis Ontológico, se puede mencionar que los resultados evidencian un efecto de nicotinamida sobre procesos biológicos relacionados con la formación de tejido óseo. Dentro de ellos podemos destacar el término “regulación de la proliferación de osteoblastos” y “proliferación de osteoclastos”. Adicionalmente se destaca el proceso “regulación negativa de la vía de señalización NIK/NF-kappaB” (Figura 20 B). Esto concuerda con el hecho de que nicotinamida es un inhibidor de Sirt1, el cual a su vez es un regulador negativo del factor de transcripción NF-KappaB, un mediador crucial de la supervivencia y regulador tanto de osteoclastos como de osteoblastos. El grupo de Chang y colaboradores realizando estudios *in vitro* con células C2C12, encontraron que la inhibición de NF-kappaB aumenta la diferenciación osteoblástica en esta línea celular. Adicionalmente, realizando estudios en ratón, pudieron determinar que al inhibir a NF-kappaB, los niveles de expresión de Colageno 1 y Osteocalcina incrementaron produciéndose simultáneamente un aumento significativo en la formación de masa ósea (Chang et al, 2009). En concordancia con esto, el grupo de Eliseev y col. han reportado que la inhibición de NF-kappaB en línea celular de osteosarcoma Saos2 conlleva a la activación de la vía de señalización Smad dependiente de BMP. Esto fue observado en células transfectadas con vectores de expresión para el inhibidor mI-kappa Beta, un regulador negativo de NF-kappaB en donde las células que sobreexpresaban el inhibidor presentaban un aumento en los niveles de fosforilación del complejo Smad1/5/8 en comparación con las células transfectadas con el vector vacío. Esto condujo a un aumento de la síntesis de marcadores osteoblásticos como ALP, Runx2 y Osteocalcina en comparación con las células

control (vector vacío). Interesantemente, observaron que la expresión del represor Smad7 disminuía significativamente en células Saos2-mI-kappa Beta. (Eliseev et al, 2005). Estos estudios establecen que el factor de transcripción NF-kappaB posee un rol modulador negativo en el proceso de osteoblastogénesis y que lo hace, al menos en parte, interfiriendo con la vía de señalización Smad (Krum et al, 2010). Lo anterior se puede complementar con el trabajo de Edwards y colaboradores, quienes estudiaron la relación existente entre el envejecimiento y la pérdida de masa ósea. Utilizando modelos de ratón, observaron que una disminución de en la expresión de Sirt1 a lo largo del tiempo condujo a una reducción de la diferenciación a osteoblastos y, por tanto, a una disminución de la masa ósea. Por otra parte, al aplicar sirtinol, un inhibidor de Sirt1, observaron que la actividad de NF-kappaB aumentó significativamente comparada con el control. Tomando estos resultados pudieron concluir que Sirt1 tanto en osteoclastos como en osteoblastos, funciona como un regulador negativo de la activación de NF-kappaB y como un factor que favorece la asociación entre formación y resorción durante el remodelamiento óseo (Edwards et al, 2013).

Por tanto, NF-kappaB y BMP juegan roles opuestos en la regulación del destino de las células osteoblásticas.

Estudios posteriores pueden profundizar aún más el rol de nicotinamida en el proceso de osificación y pueden determinar el mecanismo molecular preciso por el cual previene la diferenciación in vitro de células mesenquimales a osteoblastos, incluso descubrir nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento preventivo de Osificaciones heterotópicas. Sin embargo, proponemos como modelo que la inhibición de la diferenciación a osteoblasto es a través de un mecanismo que involucra a Sirt1 y Smad 7 como se representa e la **figura 22**.

La utilización racional de nicotinamida podría ser de gran utilidad clínica como nueva herramienta terapéutica preventiva en patologías donde ocurre formación de hueso en lugares extra-esqueléticos.

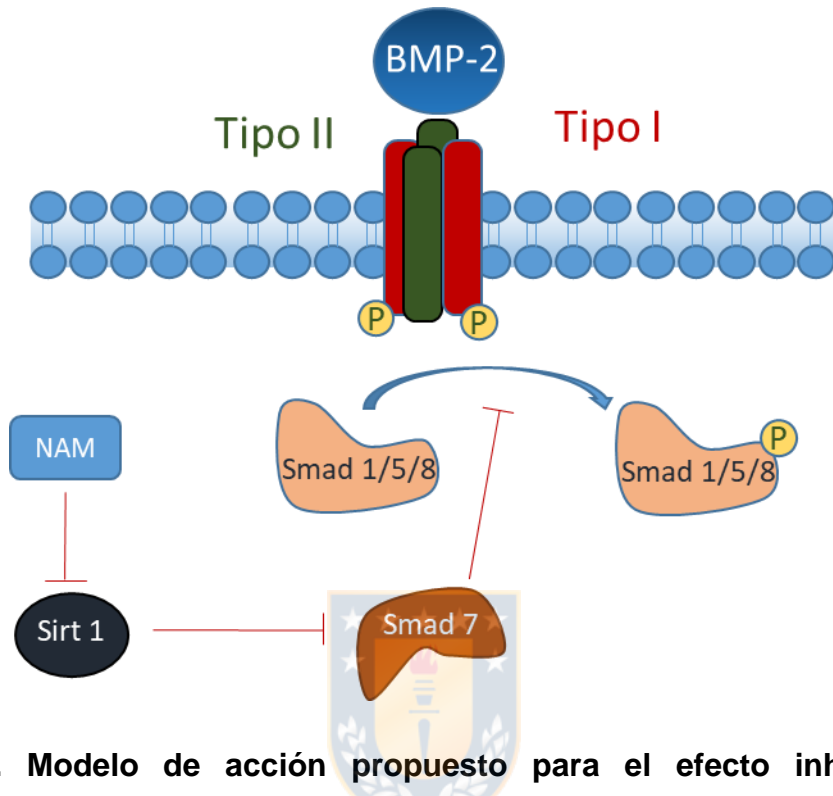


Figura 23. Modelo de acción propuesto para el efecto inhibitorio de nicotinamida sobre la fosforilación del complejo Smad 1/5/8. Nicotinamida es inhibidor de Sirt 1 que tiene como uno de sus blancos proteicos a Smad 7. Cuando está nicotinamida (NAM) presente al interior de las células, inhibe a Sirt1 y, por tanto, Smad7 se mantiene acetilado y puede ejercer su efecto inhibitorio sobre la fosforilación del complejo Smad 1/5/8. Fuente: Elaboración propia.

BIBLIOGRAFÍA

Referencias Bibliográficas

- Ashburner, M., C. A. Ball, J. A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J. M. Cherry, A. P. Davis, K. Dolinski, S. S. Dwight, J. T. Eppig, M. A. Harris, D. P. Hill, L. Issel-Tarver, A. Kasarskis, S. Lewis, J. C. Matese, J. E. Richardson, M. Ringwald, G. M. Rubin & G. Sherlock (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*, 25, 25-9.
- Baird, E. O. & Q. K. Kang (2009) Prophylaxis of heterotopic ossification - an updated review. *J Orthop Surg Res*, 4, 12.
- Balint, E., D. Lapointe, H. Drissi, C. van der Meijden, D. W. Young, A. J. van Wijnen, J. L. Stein, G. S. Stein & J. B. Lian (2003) Phenotype discovery by gene expression profiling: mapping of biological processes linked to BMP-2-mediated osteoblast differentiation. *J Cell Biochem*, 89, 401-26.
- Beederman, M., J. D. Lamplot, G. Nan, J. Wang, X. Liu, L. Yin, R. Li, W. Shui, H. Zhang, S. H. Kim, W. Zhang, J. Zhang, Y. Kong, S. Denduluri, M. R. Rogers, A. Pratt, R. C. Haydon, H. H. Luu, J. Angeles, L. L. Shi & T. C. He (2013) BMP signaling in mesenchymal stem cell differentiation and bone formation. *J Biomed Sci Eng*, 6, 32-52.
- Bitterman, K. J., R. M. Anderson, H. Y. Cohen, M. Latorre-Esteves & D. A. Sinclair (2002) Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast sir2 and human SIRT1. *J Biol Chem*, 277, 45099-107.
- Blander, G. & L. Guarente (2004) The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu Rev Biochem*, 73, 417-35.
- Bolger, A. M., M. Lohse & B. Usadel (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30, 2114-20.
- Brantus, J. F. & P. J. Meunier (1998) Effects of intravenous etidronate and oral corticosteroids in fibrodysplasia ossificans progressiva. *Clin Orthop Relat Res*, 117-20.
- Bravo-Payno, P., A. Esclarin, T. Arzoz, O. Arroyo & C. Labarta (1992) Incidence and risk factors in the appearance of heterotopic ossification in spinal cord injury. *Paraplegia*, 30, 740-5.
- Burattini, S., P. Ferri, M. Battistelli, R. Curci, F. Luchetti & E. Falcieri (2004) C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: morpho-functional characterization. *Eur J Histochem*, 48, 223-33.

- Bäckesjö, C. M., Y. Li, U. Lindgren & L. A. Haldosén (2009) Activation of Sirt1 decreases adipocyte formation during osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs*, 189, 93-7.
- Caplan, A. I. & S. P. Bruder (2001) Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med*, 7, 259-64.
- Chakkalakal, S. A., D. Zhang, A. L. Culbert, M. R. Convente, R. J. Caron, A. C. Wright, A. D. Maidment, F. S. Kaplan & E. M. Shore (2012) An Acvr1 R206H knock-in mouse has fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Bone Miner Res*, 27, 1746-56.
- Chang, J., Z. Wang, E. Tang, Z. Fan, L. McCauley, R. Franceschi, K. Guan, P. H. Krebsbach & C. Y. Wang (2009) Inhibition of osteoblastic bone formation by nuclear factor-kappaB. *Nat Med*, 15, 682-9.
- Cholok, D., M. T. Chung, K. Ranganathan, S. Ucer, D. Day, T. A. Davis, Y. Mishina & B. Levi (2018) Heterotopic ossification and the elucidation of pathologic differentiation. *Bone*, 109, 12-21.
- Cohen-Kfir, E., H. Artsi, A. Levin, E. Abramowitz, A. Bajayo, I. Gurt, L. Zhong, A. D'Urso, D. Toiber, R. Mostoslavsky & R. Dresner-Pollak (2011) Sirt1 is a regulator of bone mass and a repressor of Sost encoding for sclerostin, a bone formation inhibitor. *Endocrinology*, 152, 4514-24.
- Culbert, A. L., S. A. Chakkalakal, E. G. Theosmy, T. A. Brennan, F. S. Kaplan & E. M. Shore (2014) Alk2 regulates early chondrogenic fate in fibrodysplasia ossificans progressiva heterotopic endochondral ossification. *Stem Cells*, 32, 1289-300.
- Dennis, G., B. T. Sherman, D. A. Hosack, J. Yang, W. Gao, H. C. Lane & R. A. Lempicki (2003) DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol*, 4, P3.
- Deschaseaux, F., L. Sensébé & D. Heymann (2009) Mechanisms of bone repair and regeneration. *Trends Mol Med*, 15, 417-29.
- Drake, M. T., B. L. Clarke & S. Khosla (2008) Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc*, 83, 1032-45.
- Díaz-de la Torre, J. (2012) [Fibrodysplasia ossificans progressiva. A case report]. *Acta Ortop Mex*, 26, 192-6.
- Edwards, J. R., D. S. Perrien, N. Fleming, J. S. Nyman, K. Ono, L. Connelly, M. M. Moore, S. T. Lwin, F. E. Yull, G. R. Mundy & F. Elefteriou (2013) Silent information regulator (Sir)T1 inhibits NF-κB signaling to maintain normal skeletal remodeling. *J Bone Miner Res*, 28, 960-9.

- Eisenstein, N., S. Stapley & L. Grover (2018) Post-Traumatic Heterotopic Ossification: An Old Problem in Need of New Solutions. *J Orthop Res*, 36, 1061-1068.
- Eliseev, R. A., E. M. Schwarz, M. J. Zuscik, R. J. O'Keefe, H. Drissi & R. N. Rosier (2006) Smad7 mediates inhibition of Saos2 osteosarcoma cell differentiation by NFkappaB. *Exp Cell Res*, 312, 40-50.
- Fujii, M., K. Takeda, T. Imamura, H. Aoki, T. K. Sampath, S. Enomoto, M. Kawabata, M. Kato, H. Ichijo & K. Miyazono (1999) Roles of bone morphogenetic protein type I receptors and Smad proteins in osteoblast and chondroblast differentiation. *Mol Biol Cell*, 10, 3801-13.
- Ghosh, S. & M. Karin (2002) Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*, 109 Suppl, S81-96.
- Hall, B. K. & T. Miyake (2000) All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays*, 22, 138-47.
- Haran, M., T. Bhuta & B. Lee (2004) Pharmacological interventions for treating acute heterotopic ossification. *Cochrane Database Syst Rev*, CD003321.
- Hassel, S., S. Schmitt, A. Hartung, M. Roth, A. Nohe, N. Petersen, M. Ehrlich, Y. I. Henis, W. Sebald & P. Knaus (2003) Initiation of Smad-dependent and Smad-independent signaling via distinct BMP-receptor complexes. *J Bone Joint Surg Am*, 85-A Suppl 3, 44-51.
- Hwang, E. S. & S. B. Song (2017) Nicotinamide is an inhibitor of SIRT1 in vitro, but can be a stimulator in cells. *Cell Mol Life Sci*, 74, 3347-3362.
- Kaplan, F. S., D. L. Glaser, R. J. Pignolo & E. M. Shore (2007) A new era for fibrodysplasia ossificans progressiva: a druggable target for the second skeleton. *Expert Opin Biol Ther*, 7, 705-12.
- Kaplan, F. S., J. Groppe & E. M. Shore (2008a) When one skeleton is enough: approaches and strategies for the treatment of fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). *Drug Discov Today Ther Strateg*, 5, 255-262.
- Kaplan, F. S., M. Le Merrer, D. L. Glaser, R. J. Pignolo, R. E. Goldsby, J. A. Kitterman, J. Groppe & E. M. Shore (2008b) Fibrodysplasia ossificans progressiva. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 22, 191-205.
- Kaplan, F. S., J. A. Tabas, F. H. Gannon, G. Finkel, G. V. Hahn & M. A. Zasloff (1993) The histopathology of fibrodysplasia ossificans progressiva. An endochondral process. *J Bone Joint Surg Am*, 75, 220-30.

- Kaplan, F. S., M. A. Zasloff, J. A. Kitterman, E. M. Shore, C. C. Hong & D. M. Rocke (2010) Early mortality and cardiorespiratory failure in patients with fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Bone Joint Surg Am*, 92, 686-91.
- Katagiri, T., S. Akiyama, M. Namiki, M. Komaki, A. Yamaguchi, V. Rosen, J. M. Wozney, A. Fujisawa-Sehara & T. Suda (1997) Bone morphogenetic protein-2 inhibits terminal differentiation of myogenic cells by suppressing the transcriptional activity of MyoD and myogenin. *Exp Cell Res*, 230, 342-51.
- Katagiri, T., A. Yamaguchi, M. Komaki, E. Abe, N. Takahashi, T. Ikeda, V. Rosen, J. M. Wozney, A. Fujisawa-Sehara & T. Suda (1994) Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol*, 127, 1755-66.
- Kim, D., G. Pertea, C. Trapnell, H. Pimentel, R. Kelley & S. L. Salzberg (2013) TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol*, 14, R36.
- Krum, S. A., J. Chang, G. Miranda-Carboni & C. Y. Wang (2010) Novel functions for NFκB: inhibition of bone formation. *Nat Rev Rheumatol*, 6, 607-11.
- Kume, S., M. Haneda, K. Kanasaki, T. Sugimoto, S. Araki, K. Isshiki, M. Isono, T. Uzu, L. Guarente, A. Kashiwagi & D. Koya (2007) SIRT1 inhibits transforming growth factor beta-induced apoptosis in glomerular mesangial cells via Smad7 deacetylation. *J Biol Chem*, 282, 151-8.
- Langmead, B. & S. L. Salzberg (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*, 9, 357-9.
- Langmead, B., C. Trapnell, M. Pop & S. L. Salzberg (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol*, 10,R25.
- Li, H., B. Handsaker, A. Wysoker, T. Fennell, J. Ruan, N. Homer, G. Marth, G. Abecasis, R. Durbin & G. P. D. P. Subgroup (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25, 2078-9.
- Long, F. (2012) Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13, 27-38.
- Lounev, V. Y., R. Ramachandran, M. N. Wosczyzna, M. Yamamoto, A. D. Maidment, E. M. Shore, D. L. Glaser, D. J. Goldhamer & F. S. Kaplan (2009) Identification of progenitor cells that contribute to heterotopic skeletogenesis. *J Bone Joint Surg Am*, 91, 652-63.

- Maiese, K., Z. Z. Chong, J. Hou & Y. C. Shang (2009) The vitamin nicotinamide: translating nutrition into clinical care. *Molecules*, 14, 3446-85.
- Martin, J. A. & Z. Wang (2011) Next-generation transcriptome assembly. *Nat Rev Genet*, 12, 671-82.
- Miyazawa, K. & K. Miyazono (2017) Regulation of TGF- β Family Signaling by Inhibitory Smads. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 9.
- Miyazono, K., S. Maeda & T. Imamura (2005) BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev*, 16, 251-63.
- Mutz, K. O., A. Heilkenbrinker, M. Lönne, J. G. Walter & F. Stahl (2013) Transcriptome analysis using next-generation sequencing. *Curr Opin Biotechnol*, 24, 22-30.
- Ozsolak, F. & P. M. Milos (2011) RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nat Rev Genet*, 12, 87-98.
- Phimphilai, M., Z. Zhao, H. Boules, H. Roca & R. T. Franceschi (2006) BMP signaling is required for RUNX2-dependent induction of the osteoblast phenotype. *J Bone Miner Res*, 21, 637-46.
- Pignolo, R. J., E. M. Shore & F. S. Kaplan (2011) Fibrodysplasia ossificans progressiva: clinical and genetic aspects. *Orphanet J Rare Dis*, 6, 80.
- Pignolo, R. J., E. M. Shore & F. S. Kaplan (2013) Fibrodysplasia ossificans progressiva: diagnosis, management, and therapeutic horizons. *Pediatr Endocrinol Rev*, 10 Suppl 2, 437-48.
- Quevedo, I. (2014). High doses of nicotinamide effect prolonged remissions of flare-ups in two children with fibrodysplasia ossificans progressiva: a 5 year follow up. Research.
- Ranganathan, K., S. Loder, S. Agarwal, V. W. Wong, V. C. Wong, J. Forsberg, T. A. Davis, S. Wang, A. W. James & B. Levi (2015) Heterotopic Ossification: Basic-Science Principles and Clinical Correlates. *J Bone Joint Surg Am*, 97, 1101-11.
- Ringnér, M. (2008) What is principal component analysis? *Nat Biotechnol*, 26, 303-4.
- Russell, R. G., R. C. Mühlbauer, S. Bisaz, D. A. Williams & H. Fleisch (1970) The influence of pyrophosphate, condensed phosphates, phosphonates and other phosphate compounds on the dissolution of hydroxyapatite in vitro

and on bone resorption induced by parathyroid hormone in tissue culture and in thyroparathyroidectomised rats. *Calcif Tissue Res*, 6, 183-96.

Sagi, H. C., C. J. Jordan, D. P. Barei, R. Serrano-Riera & B. Steverson (2014) Indomethacin prophylaxis for heterotopic ossification after acetabular fracture surgery increases the risk for nonunion of the posterior wall. *J Orthop Trauma*, 28, 377-83.

Schmittgen, T. D. & K. J. Livak (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*, 3, 1101-8.

Schroeder, T. M., E. D. Jensen & J. J. Westendorf (2005) Runx2: a master organizer of gene transcription in developing and maturing osteoblasts. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 75, 213-25.

Shafer, D. M., C. Bay, D. M. Caruso & K. N. Foster (2008) The use of eidronate disodium in the prevention of heterotopic ossification in burn patients. *Burns*, 34, 355-60.

Shakibaei, M., P. Shayan, F. Busch, C. Aldinger, C. Buhrmann, C. Lueders & A. Mobasher (2012) Resveratrol mediated modulation of Sirt-1/Runx2 promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells: potential role of Runx2 deacetylation. *PLoS One*, 7, e35712.

Shore, E. M., M. Xu, G. J. Feldman, D. A. Fenstermacher, T. J. Cho, I. H. Choi, J. M. Connor, P. Delai, D. L. Glaser, M. LeMerrer, R. Morhart, J. G. Rogers, R. Smith, J. T. Triffitt, J. A. Urtizberea, M. Zasloff, M. A. Brown & F. S. Kaplan (2006) A recurrent mutation in the BMP type I receptor ACVR1 causes inherited and sporadic fibrodysplasia ossificans progressiva. *Nat Genet*, 38, 525-7.

Supek, F., M. Bošnjak, N. Škunca & T. Šmuc (2011) REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One*, 6, e21800.

Thickman, D., A. Bonakdar-pour, M. Clancy, J. Van Orden & H. Steel (1982) Fibrodysplasia ossificans progressiva. *AJR Am J Roentgenol*, 139, 935-41.

Thorvaldsdóttir, H., J. T. Robinson & J. P. Mesirov (2013) Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform*, 14, 178-92.

Towbin, H., T. Staehelin & J. Gordon (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 4350-4.

Ungerstedt, J. S., M. Blömbäck & T. Söderström (2003) Nicotinamide is a potent inhibitor of proinflammatory cytokines. *Clin Exp Immunol*, 131, 48-52.

- Urist, M. R. (1997) Bone morphogenetic protein: the molecularization of skeletal system development. *J Bone Miner Res*, 12, 343-6.
- Wang, A., X. Ding, S. Sheng & Z. Yao (2008) Retinoic acid inhibits osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 375,435-9.
- Wang, L., S. Wang & W. Li (2012) RSeQC: quality control of RNA-seq experiments. *Bioinformatics*, 28, 2184-5.
- Wang, R. N., J. Green, Z. Wang, Y. Deng, M. Qiao, M. Peabody, Q. Zhang, J. Ye, Z. Yan, S. Denduluri, O. Idowu, M. Li, C. Shen, A. Hu, R. C. Haydon, R. Kang, J. Mok, M. J. Lee, H. L. Luu & L. L. Shi (2014) Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes Dis*, 1, 87-105.
- Wang, Z., M. Gerstein & M. Snyder (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*, 10, 57-63.
- Woo, S. B., J. W. Hellstein & J. R. Kalmar (2006) Narrative [corrected] review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. *Ann Intern Med*, 144, 753-61.
- Wu, M., G. Chen & Y. P. Li (2016) TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res*, 4, 16009.
- Zainabadi, K., C. J. Liu, A. L. M. Caldwell & L. Guarente (2017a) SIRT1 is a positive regulator of in vivo bone mass and a therapeutic target for osteoporosis. *PLoS One*, 12, e0185236.
- Zainabadi, K., C. J. Liu & L. Guarente (2017b) SIRT1 is a positive regulator of the master osteoblast transcription factor, RUNX2. *PLoS One*, 12, e0178520.
- Zhang, C. (2010) Transcriptional regulation of bone formation by the osteoblast-specific transcription factor *Osx*. *J Orthop Surg Res*, 5, 37.