

LOS FITOESTRÓGENOS COMO AGENTES MODULADORES DEL METABOLISMO ÓSEO

A.R. DE GORTÁZAR

LABORATORIO DE METABOLISMO MINERAL Y ÓSEO.
FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ. MADRID.

INTRODUCCIÓN

Los estrógenos son los principales responsables del mantenimiento de la masa ósea en la mujer y, junto a los andrógenos, también en el hombre adulto¹. De hecho, la osteoporosis asociada a la deficiencia estrogénica tras la menopausia constituye la causa principal de pérdida de masa ósea con la edad. La terapia de reemplazo estrogénico se considera el método más eficaz para reducir la pérdida de masa ósea asociada a la osteoporosis posmenopáusica; aunque no está exenta de efectos secundarios indeseables (por ejemplo, aparición de tumores hormono-dependientes)^{1,2}. Actualmente, se considera que los factores nutricionales son importantes para modular el pico y la subsiguiente pérdida de masa ósea asociada a la edad y a la deficiencia estrogénica³.

Los fitoestrógenos son un grupo heterogéneo de compuestos no esteroideos derivados de plantas, con propiedades beneficiosas para el metabolismo celular (por ejemplo, su acción antioxidante y antiagregante plaquetaria) y que poseen similitud estructural y funcional con los estrógenos^{4,5}. Esta similitud estructural les permite unirse a los receptores estrogénicos (ER)- α y $-\beta$, aunque con una afinidad entre 100-1.000 veces inferior a la del 17 β -estradiol ($K_d \cong 0,1$ nM). Sin embargo, la actividad transcripcional de los fitoestrógenos y del 17 β -estradiol es de la misma intensidad en las células óseas⁶. Diversos estudios *in vitro* e *in vivo*, detallados a continuación, han atraído el interés hacia estos compuestos, en particular las isoflavono-

nas, abundantes en la soja, genisteína y daidzeína, por su potencial terapéutico alternativo en la osteoporosis.

ESTUDIOS *IN VITRO*

ACCIONES DE LOS FITOESTRÓGENOS SOBRE LAS CÉLULAS OSTEABLÁSTICAS

La mayoría de los estudios *in vitro* para evaluar los efectos de los fitoestrógenos sobre las células osteoblásticas apoyan su papel osteogénico. Así, la genisteína y la daidzeína aumentan la actividad de la fosfatasa alcalina (un marcador temprano de la diferenciación osteoblástica), la formación de nódulos mineralizados y la expresión y secreción de osteocalcina (un marcador tardío de la diferenciación) en cultivos de células osteoblásticas⁷⁻⁹. Recientemente, se ha observado que la daidzeína aumenta la producción de la proteína morfogenética ósea (BMP)-2, un factor implicado en las fases tempranas de diferenciación del linaje osteoblástico, en cultivo primario de osteoblastos de rata¹⁰.

Además, estas isoflavonas afectan al sistema compuesto por la osteoprotegerina (OPG), el receptor activador de NF- κ B (RANK) y su ligando (RANKL). La unión de RANKL, producido por los osteoblastos, a RANK, en la membrana de las células osteoclasticas, induce su activación y diferenciación por los osteoblastos¹¹. La OPG, también producida por los osteoblastos, es una proteína secretada que se une a RANKL impidiendo su unión a RANK y por tanto la activación osteoclastica¹¹. La daidzeína parece aumentar tanto la secreción de OPG como la de RANKL en los osteoblastos de hueso trabecular porcino⁷. En este trabajo, los autores sugieren que el incremento en la secreción de ambas proteínas podría favorecer la unión entre ellas y, por lo tanto, disminuir la cantidad de

RANKL disponible para activar la osteoclastogénesis⁷. Se ha demostrado que la genisteína estimula la expresión de OPG en cultivos primarios de osteoblastos de hueso trabecular humano y en la línea celular osteoblástica de ratón MC3T3-E1^{12,13}. Además, en un estudio reciente se ha observado que la genisteína incrementa la relación OPG/ RANKL en células estromales de médula ósea humana¹⁴. En estos cultivos, en los que existen células mesenquimales con capacidad para diferenciarse tanto a osteoblastos como a adipocitos, la genisteína favorece la diferenciación osteoblástica, estimulando la expresión de la fosfatasa alcalina, OPG y del factor de crecimiento transformante (TGF)- β , mientras que reprime la diferenciación de los adipocitos, inhibiendo la expresión del receptor activado por proliferadores del peroxisoma (PPAR)- γ ¹⁴. Por su parte, la daidzeína parece ejercer efectos bifásicos sobre la diferenciación de estos dos tipos celulares, dependiendo de la dosis utilizada¹⁵. Así, estimula la osteogénesis y disminuye la adipogénesis a dosis bajas (menos de 20 μ M) mientras que, a dosis más altas (más de 30 μ M) aumenta la diferenciación de los adipocitos¹⁵.

Por otra parte, las isoflavonas parecen afectar también a la viabilidad de las células osteoblásticas. Así, tanto la genisteína como la daidzeína protegen de la apoptosis inducida por el factor de necrosis tumoral (TNF)- α en las células osteoblásticas MC3T3-E1¹⁶. En estas células, la estimulación de citocinas osteolíticas, como la interleucina (IL)-6 y la prostaglandina (PG)-E₂, inducida por TNF- α se inhibió por ambos fitoestrógenos¹⁶. El resveratrol es otro fitoestrógeno natural, que se encuentra en la piel de la uva, con acciones sobre los osteoblastos. Este compuesto estimula la proliferación y la actividad de la fosfatasa alcalina e inhibe la producción de PGE₂ en las células MC3T3-E1¹⁷. Datos recientes de nuestro grupo indican que los fitoestrógenos genisteína, daidzeína y

Correspondencia: A.R. de Gortázar.
Laboratorio de Metabolismo Mineral y Óseo.
Fundación Jiménez Díaz-UTE.
Avda. Reyes Católicos, 2.
28040 Madrid.
Correo electrónico: argortazar@uams.edu

resveratrol afectan a la diferenciación en las células del osteosarcoma humano de fenotipo osteoblástico MG-63: aumentan la actividad de la fosfatasa alcalina, la expresión de osteocalcina y de OPG, e inhiben la expresión de IL-6 a través del NF- κ B¹⁸. Las dosis eficaces de estos compuestos (10 nM-1 μ M), utilizadas en la mayoría de los estudios mencionados, son fácilmente alcanzables en una dieta oriental típica¹⁹. En cuanto a sus mecanismos de acción, los fitoestrógenos pueden actuar directamente sobre los osteoblastos a través de la activación de los ER⁴. De hecho, los ER- α y - β se expresan en los osteoblastos humanos dependiendo del grado de diferenciación⁶. En este sentido, el aumento de expresión del ER β que ocurre durante la fase de mineralización es importante por el hecho de que algunos de estos compuestos, como la genisteína, tienen más afinidad por este receptor que por el ER α ^{4,20}. Por otra parte, la genisteína estimula la expresión del ER α en cultivo primario de osteoblastos de hueso trabecular humano¹²; mientras que la daidzeína incrementa la expresión del ER β sin afectar a la del ER α en cultivo primario de osteoblastos de hueso trabecular porcino⁸. Existen también una serie de mecanismos no genómicos mediante los que los fitoestrógenos pueden ejercer sus acciones en los osteoblastos: inhibición de tirosina quinasa, inhibición de topoisomerasa II o activación de un posible receptor en la membrana de estas células^{4,21}. Sin embargo, la gran mayoría de los efectos de los fitoestrógenos sobre los osteoblastos antes mencionados parecen mediados por mecanismos genómicos a través de los ER, ya que revierten con inhibidores de estos receptores, como el ICI 182,780 o el tamoxifeno^{7,12,13,17,18}.

ACCIONES DE LOS FITOESTRÓGENOS SOBRE LAS CÉLULAS OSTEOCLÁSTICAS

Existen algunos estudios que indican que los fitoestrógenos pueden modular la actividad de los osteoclastos, aunque los mecanismos implicados no están del todo claros. Así, los fitoestrógenos (entre 10 nM-10 μ M) provocan una disminución en el número de osteoclastos y en su actividad en distintas preparaciones de osteoclastos. El coumestrol, otro fitoestrógeno, disminuye

el número de células positivas para la fosfatasa ácida dependiente de tartrato (TRAP) y su actividad, inducida por RANKL, en cultivos de células RAW 264.7 transfectadas con ER α ²². Además, el coumestrol disminuye el ARNm del receptor de calcitonina en estas células²².

La genisteína y la daidzeína también disminuyen el número de células TRAP positivas en células osteoclasticas multinucleadas (MNC)²³. Además, esta última isoflavona inhibe el número de osteoclastos, el área de resorción y la diferenciación de los progenitores de osteoclastos en células de médula ósea porcina²⁴. Estos efectos se asocian al aumento la fragmentación del ADN y a la activación de la caspasa-3 (que revierte por ICI 182,780), además de provocar un aumento de expresión de los ER²⁴.

ESTUDIOS *IN VIVO*

Los estudios *in vivo* permiten analizar los efectos de los fitoestrógenos sobre un sistema intacto, además de analizar su metabolismo. De hecho, su absorción intestinal parece tener un papel crucial en la biodisponibilidad de estos compuestos²⁵.

ACCIONES ÓSEAS DE LOS FITOESTRÓGENOS EN MODELOS ANIMALES

La mayoría de los estudios *in vivo* con fitoestrógenos han sido llevados a cabo en roedores ovariectomizados. Los datos resultantes de estos estudios indican una mejora significativa en la retención de masa ósea tras la ovariectomía inducida por el tratamiento con fitoestrógenos.

Los primeros estudios con modelos animales examinaron los efectos de una dieta rica en proteínas de la soja²⁶, o el de la leche de soja²⁷, en ratas ovariectomizadas. Se observó una mayor densidad mineral ósea (DMO) en las ratas alimentadas con soja que en las ratas control²⁶. Además, se demostraba que estas proteínas aisladas de la soja eran tan eficaces como el 17 β -estradiol en retardar la pérdida de masa ósea²⁶. Comparando el efecto de la daidzeína con el de la genisteína y el del 17 β -estradiol administrados durante 3 meses a ratas ovariectomizadas, se observó que la daidzeína

(10 μ g/g de peso por día), al igual que el 17 β -estradiol (30 μ g/g de peso por día), eran más eficaces que la genisteína (10 μ g/g de peso por día) en la prevención de la pérdida de masa ósea²⁸.

Recientemente, se ha comparado el efecto de extractos de isoflavonas (6,25 g/kg/día) con el del 17 β -estradiol en ratas ovariectomizadas durante 16 semanas²⁹. Ambos tratamientos demostraron ser eficaces en la prevención de la pérdida de masa ósea. Sin embargo, el tratamiento con isoflavonas no disminuyó de modo significativo la fosfatasa alcalina ni la actividad de TRAP séricas; mientras que el tratamiento con 17 β -estradiol revirtió estos dos marcadores óseos a niveles basales²⁹. Resultados similares se han observado en ratones ovariectomizados. Así, el tratamiento con genisteína (45 mg/kg/día) en estos ratones produce un aumento significativo en la DMO, en la fosfatasa alcalina y en la osteocalcina circulantes³⁰. En un estudio reciente se observó que la combinación de la daidzeína (200 mg/kg dieta) con una dosis alta de calcio (25 g/kg de dieta) durante 12 semanas afecta favorablemente al hueso trabecular y cortical, en ratones ovariectomizados³¹.

ACCIONES ÓSEAS DE LOS FITOESTRÓGENOS EN SERES HUMANOS

Existen varios estudios observacionales llevados a cabo en mujeres de países asiáticos, donde la ingesta de estos compuestos por la dieta es alta (15-50 mg/día)⁶. En estos estudios, se ha observado una correlación negativa entre la toma de isoflavonas y la excreción de marcadores de resorción ósea en mujeres posmenopáusicas y una correlación positiva con el mantenimiento de la masa ósea⁶.

Un estudio realizado en mujeres posmenopáusicas ha demostrado que 60 mg/día de isoflavonas durante 12 semanas se asocia a un aumento en la osteocalcina sérica y una disminución del N-telopéptido urinario (NTX), un marcador de resorción ósea³².

Estudios realizados en mujeres peri y posmenopáusicas han revelado que una dieta rica en estos compuestos (50-90 mg isoflavonas/día durante 6 meses) aumenta la DMO en las vértebras lumbares, aunque no en el fémur^{33,34}.

Un estudio reciente más largo realizado en mujeres posmenopáusicas durante dos años demuestra que una administración diaria de leche de soja con un contenido en isoflavonas de 76 mg protege de la pérdida de masa ósea en las vértebras lumbares pero no se observaron cambios en el fémur³⁵.

Así pues, estos hallazgos indican que los fitoestrógenos afectan tanto a la formación como a la resorción ósea, fundamentalmente en el hueso trabecular.

CONCLUSIONES

Los estudios llevados a cabo hasta el momento con los fitoestrógenos sugieren su efecto positivo en el mantenimiento de la masa ósea, a través de sus acciones tanto sobre la formación como sobre la resorción ósea. Por tanto, podrían ser una alternativa dietética a la terapia hormonal sustitutiva, al menos en ciertos casos, en la osteoporosis posmenopáusica. Sin embargo, no existen estudios que permitan establecer su utilidad en la prevención de fracturas en la osteoporosis.

BIBLIOGRAFÍA

- Riggs BL, Khosla S, Melton LG. A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *J Bone Miner Res.* 1998;13:763-73.
- Mahavni V, Sood AK. Hormone replacement therapy and cancer risk. *Curr Opin Oncol.* 2001;13:384-9.
- Sánchez A, Puche R, Zeni S, et al. Papel del calcio y de la vitamina D en la salud ósea. *Reumo.* 2003;12:14-29.
- Anderson JJ, Garner SC. Phytoestrogens and bone. *Clin Endocrinol Metab.* 1998;12:543-57.
- Anderson JJB, Messina M, Garner SC. Effects of phyto-estrogens on tissues. *Nutr Res Rev.* 1999;12:75-116.
- Setchell KD, Lydeking-Olsen E. Dietary phytoestrogens and their effects on bone: evidence from in vivo and in vitro, human observational, and dietary intervention studies. *Am J Clin Nutr.* 2003;78 3Supl:593S-609S.
- De Wilde A, Lieberherr M, Colin C, Pointillart A. A low dose of daidzein acts as an ERB-selective agonist in trabecular osteoblasts of young female piglets. *J Cell Physiol.* 2004;200:253-62.
- Kanno S, Hirano S, Kayama F. Effects of phytoestrogens and environmental estrogens on osteoblastic differentiation in MC3T3-E1. *Toxicology.* 2004;196:137-45.
- Chang H, Jin TY, Gu SZ, Zhou YF. Modulation of isoflavones on bone-nodule formation in rat calvaria osteoblasts in vitro. *Biomed Environ Sci.* 2003;16:83-9.
- Jia TL, Wang HZ, Xie LP, Wang XY, Zhang RQ. Daidzein enhances osteoblast growth that may be mediated by increase bone morphogenetic protein (BMP) production. *Biochem Pharmacol.* 2003;65:709-15.
- Hofbauer LC. Osteoprotegerin ligand and osteoprotegerin: novel implications for osteoclast biology and bone metabolism. *Eur J Endoc.* 1999;141:195-210.
- Viereck V, Grundker C, Blaschke S, Siggelkow H, Emons G, Hofbauer LC. Phytoestrogen genistein stimulates the production of osteoprotegerin by human trabecular osteoblasts. *J Cell Biochem.* 2002;84:725-35.
- Chen X, Garner SC, Quarles LD, Anderson JJ. Effects of genistein on expression of bone markers during MC3T3-E1 osteoblastic cell differentiation. *J Nutr Biochem.* 2003;14:342-9.
- Heim M, Frank O, Kampmann G, Sochocky N, Pennimpede T, Fuchs P, et al. The phytoestrogen genistein enhances osteogenesis and represses adipogenic differentiation of human primary bone marrow stromal cells. *Endocrinology.* 2004;145:848-59.
- Dang Z, Lowik CW. The balance between concurrent activation of ERs and PPARs determines daidzein-induced osteogenesis and adipogenesis. *J Bone Miner Res.* 2004;19:853-61.
- Suh KS, Koh G, Park CY, Woo JT, Kim SW, Kim JW, et al. Soybean isoflavones inhibit tumor necrosis factor- α -induced apoptosis and the production of interleukin-6 and prostaglandin E2 in osteoblastic cells. *Phytochemistry.* 2003;63:209-15.
- Mizutani K, Ikeda K, Kawai Y, Yamori Y. Resveratrol stimulates the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;253:859-63.
- De Gortázar AR, Alonso V, Esbrit P. Anabolic effects of the phytoestrogens genistein, daidzein and resveratrol in human osteoblastic MG-63 cells [abstract]. *J Bone Miner Res.* 2004;19:S143.
- Chen XW, Garner SC, Anderson JJB. Isoflavones regulate interleukin-6 and osteoprotegerin synthesis during osteoblast cell differentiation via an estrogen-receptor-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;295:417-22.
- Arts J, Kuiper GG, Janssen JM, Gustafsson JA, Lowik CW, Pols HA, et al. Differential expression of estrogen receptors α and β mRNA during differentiation of human osteoblast SV-HFO cells. *Endocrinology.* 1997;138:5067-70.
- Yamagishi T, Otsuka E, Hagiwara H. Reciprocal control of expression of mRNAs for osteoclast differentiation factor and OPG in osteogenic stromal cells by genistein: evidence for the involvement of topoisomerase II in osteoclastogenesis. *Endocrinology.* 2001;142:3632-7.
- Kanno S, Hirano S, Kayama F. Effects of the phytoestrogen coumestrol on RANK-ligand-induced differentiation of osteoclasts. *Toxicology.* 2004;203:211-20.
- Gao YH, Yamaguchi M. Suppressive effects of genistein on rat bone osteoclasts: apoptosis is induced through Ca^{2+} signaling. *Biol Pharm Bull.* 1999;22:805-9.
- Rassi CM, Lieberherr M, Chaumaz G, Pointillart A, Cournot G. Down-regulation of osteoclast differentiation by daidzein via caspase 3. *J Bone Miner Res.* 2002;17:630-8.
- Setchell KDR, Brown NB, Zimmer-Nechemias L, Brashear WT, Wolfe BE, Kirschner AS, et al. Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2002;76:447-53.
- Arjmandi BH, Alekel L, Hollis BW, Amin D, Stacewicz-Sapuntzakis M, Guo P, et al. Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *J Nutr.* 1996;126:161-7.
- Omi N, Aoi S, Murata K, Ezawa I. Evaluation of the effects of soybean milk and soybean milk peptides on bone metabolism in the rat model with ovariectomized osteoporosis. *J Nutr Sci Vitaminol.* 1994;40:201-11.
- Picherit C, Coxam V, Bennetau-Pelissero C, Kati-Coulibaly S, Davicco MJ, Lebecque P, et al. Daidzein is more efficient than genistein in preventing ovariectomy-induced bone loss in rats. *J Nutr.* 2000;130:1675-81.
- Lee YB, Lee HJ, Kim KS, Lee SY, Cheon SH, Sohn HS, et al. Evaluation of the preventive effect of isoflavone extract on bone loss in ovariectomized rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2004;68:1040-5.
- Li B, Yu S. Genistein prevents bone resorption diseases by inhibiting bone resorption and stimulating bone formation. *Biol Pharm Bull.* 2003;26:780-6.
- Fonseca D, Ward WE. Daidzein together with high calcium preserve bone mass and biomechanical strength at multiple sites in ovariectomized mice. *Bone.* 2004;35:489-97.
- Scheiber MD, Liu JH, Subbiah MT, Rebar RW, Setchell KD. Dietary inclusion of whole soy foods results in significant reductions in clinical risk factors for osteoporosis and cardiovascular disease in normal postmenopausal women. *Menopause.* 2001;8:384-92.
- Potter SM, Baum JA, Teng H, Stillman RJ, Erdman JW Jr. Soy protein and isoflavones: Their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 1998;68:1375S-79S.
- Alekel DL, Germain AS, Peterson CT, Hanson KB, Stewart JW, Toda T. Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 2000;72:844-52.
- Lydeking-Olsen E, Beck-Jensen JE, Setchell KD, Holm-Jensen T. Soy milk or progesterone for prevention of bone loss—a 2 year randomized, placebo-controlled trial. *Eur J Nutr.* 2004;43:246-57.