

UCH-FC  
Biotecnología  
M686  
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

**EFFECTO DE BIFOSFONATOS EN LOS NIVELES DE  $\beta$ -CATENINA Y LA  
EXPRESIÓN DE RANKL EN CÉLULAS DE ESTROMA DE MÉDULA ÓSEA**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de  
los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

NICOLÁS GONZALO MÉNDEZ DINAMARCA

Directora de Seminario de Título: Dra. Mireya Fernández Gálvez

Mayo de 2012

Santiago – Chile



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, que el Seminario de Título presentado por el Sr.

**NICOLÁS GONZALO MÉNDEZ DINAMARCA**

**“Efecto de bifosfonatos en los niveles de  $\beta$ -catenina activa y la expresión de RANKL en células de estroma de médula ósea”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dra. Mireya Fernández Gálvez  
**Directora Seminario de Título**

### **Comisión de Evaluación**

Dr. Marco Tulio Núñez González  
**Presidente Comisión**

Dra. Magdalena Sanhueza  
**Correctora**

Dra. María Rosa Bono  
**Patrocinante**

Se muestran tres firmas manuscritas en azul sobre líneas horizontales. La primera firma es la de la Directora. A la derecha de las firmas se encuentra un sello circular de la Facultad de Ciencias, Biblioteca Central, U. de Chile.

Santiago, Mayo de 2012



## Autobiografía



Me contaron que nací el 9 de Septiembre de 1986 en Chillán, pero soy de San Carlos, lugar donde se fabrican las longanizas que entrego a pedido. Cuando era chico me gustaba clasificar, ordenar y coleccionar cosas, construir pruebas con obstáculos para los bichos, leer icaritos, leer enciclopedias, el atlas, el diccionario y la guía de teléfono. En la básica, era un cabro chico porfiado y preguntón, mis profesoras se encargan de recordármelo cada vez que me vuelven a ver. Ya más grande, se me ha ido quitando lo ordenado y lo preguntón, ahora escucho y espero a que la respuesta aparezca, o me respondo solo, pero no siempre. En enseñanza media decidí que quería estudiar una carrera científica en el área de la biología. La biotecnología molecular es lo que engloba todo lo que quería, biología con toques de física, química y matemática. Distanciarse de la familia, del pueblo y de todo, y empezar de nuevo fue complicado sólo al comienzo, los amigos que hoy tengo, que de alguna u otra forma los conocí debido a estudiar esta carrera, compartieron conmigo esta entretenida etapa y permitieron que me sintiera acompañado en el día a día. Ya que cambié mi biografía por escribir las cosas que me gustan, también me gusta Pokémon, SNSD, el té con 3 ó 4 de azúcar y el ketchup. En la U me di cuenta que me gusta aprender y enseñar, como también esto de conocer, manejar y dirigir un grupo de trabajo hacia algún objetivo, como cuando había que armar algún proyecto o estudiar en grupo. Para el futuro espero realizar algo así, investigar en equipo.

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer a mi familia por siempre apoyarme en mis decisiones.

A la profe Mireya por recibirme en el laboratorio, enseñarme, aconsejarme, y aguantarme.

A mis amigos por apoyarme y sobrevalorarme.

A mis compañeros, amigos y los profes del lab por ayudarme con sus conocimientos y hacer que el trabajo fuera en un ambiente agradable, distendido y alegre.

A mi conocida "señora" por hacerme sentir como parte de su familia.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
<b>1. RESUMEN</b>	1
1.1. Abstract	2
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	3
2.1. Metabolismo óseo	3
2.2. Mieloma múltiple y remodelación ósea desregulada	3
2.3. Bifosfonatos	5
2.4. Acción biológica de los bifosfonatos	6
2.5. Vía Wnt en el metabolismo óseo	9
2.6. Hipótesis, objetivo general y objetivos específicos	12
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	13
3.1. Materiales	13
3.1.1. Equipos e instrumentos	13
3.1.2. Material biológico	13
3.1.3. Material de plástico	13
3.1.4. Reactivos para cultivo celular	13
3.1.5. Anticuerpos	14
3.1.6. Proteínas recombinantes	14
3.1.7. Inhibidores de proteasas	14
3.1.8. Reactivos químicos	15
3.1.9. Kits y otros	15
3.1.10. Softwares	16
3.2. Métodos	16

3.2.1.	Cultivo celular	16
3.2.2.	Evaluación de la viabilidad celular por ensayo MTS	17
3.2.3.	Análisis por RT-PCR	17
3.2.4.	Tratamiento con moduladores de la vía Wnt	18
3.2.5.	Tratamiento con bifosfonatos	19
3.2.6.	Reactivación de la vía Wnt por zoledronato	19
3.2.7.	Inmunoblot	19
3.2.8.	Inmunofluorescencia	20
3.2.9.	Análisis estadístico	21
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>22</b>
4.1.	Efecto de bifosfonatos en la viabilidad celular	22
4.2.	Las líneas celulares HS-5 y Saos-2 expresan componentes de la vía Wnt canónica	23
4.3.	Acción de moduladores de la vía Wnt canónica: cambio en los niveles de $\beta$ -catenina activa	24
4.4.	Bifosfonatos aumentan los niveles de $\beta$ -catenina activa	26
4.5.	Bifosfonatos disminuyen la expresión de RANKL	29
4.6.	Bifosfonatos inducen la localización de $\beta$ -catenina en el núcleo	31
4.7.	El efecto de zoledronato sobre los niveles de $\beta$ -catenina y RANKL se mantiene en células cuya actividad de la vía Wnt se encuentra inhibida por DKK-1	33
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>35</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>42</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>43</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1.</b> Partidores y condiciones de las reacciones de PCR	18

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Componentes Celulares de la Remodelación Ósea.	4
<b>Figura 2.</b> Resorción ósea en el mieloma múltiple.	5
<b>Figura 3.</b> Bifosfonatos utilizados en clínica.	6
<b>Figura 4.</b> Diagrama de la vía del mevalonato	8
<b>Figura 5.</b> Diagrama de la vía de señalización Wnt.	10
<b>Figura 6.</b> Efecto de bifosfonatos en la viabilidad celular	22
<b>Figura 7.</b> HS-5 y Saos-2 expresan componentes de la vía Wnt	23
<b>Figura 8.</b> Células HS-5 y Saos-2 responden a activadores e inhibidores de la vía Wnt canónica	25
<b>Figura 9.</b> Bifosfonatos inducen la acumulación de $\beta$ -catenina activa	27
<b>Figura 10.</b> Efecto de bifosfonatos sobre la acumulación de $\beta$ -catenina activa	28
<b>Figura 11.</b> Bifosfonatos reducen la expresión de RANKL	30
<b>Figura 12.</b> Bifosfonatos inducen la acumulación nuclear de $\beta$ -catenina	32
<b>Figura 13.</b> Efecto de zoledronato en presencia de DKK-1 sobre $\beta$ -catenina y RANKL	34
<b>Figura 14.</b> Posible mecanismo de activación de la vía Wnt por Bifosfonatos	40

## LISTA DE ABREVIATURAS

- APC: Adenomatosis polyposis coli  
ATP: Adenosín trifosfato  
BSA: Albúmina de suero bovino  
CK1: Caseína quinasa 1  
DKK-1: Dickkopf-1  
Dsh: Disheveled  
e.s.m.: Error estándar de la media  
FPPS: Farnesil pirofosfato sintasa  
FRAT: Frequently rearranged in advanced T-cell lymphoma (proteína)  
Frz: Frizzled  
GSK3 $\beta$ : Glicógeno sintasa 3 beta  
iba: Ibandronato  
IgG: Inmunoglobulina G  
LEF: Factor que se une a enhancer linfoide (factor de transcripción)  
LRP: Proteína relacionada al receptor de lipoproteína de baja densidad  
mRNA: Ácido ribonucleico mensajero  
MTS: 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio  
OPG: Osteoprotegerina  
PMS: Metosulfato de fenazina  
RANKL: Ligando del Receptor Activador del factor Nuclear  $\kappa$ B  
RIPA: Buffer para radio immuno precipitation assay (buffer de lisis)  
RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa  
sFRP: Proteína soluble relacionada a frizzled  
TCF: Factor de célula T (factor de transcripción)  
zol: Zoledronato  
 $\beta$ -TrCP: Proteína que contiene repetidos de beta-transducina



## 1. RESUMEN

Los bifosfonatos son una clase de fármacos que actúan disminuyendo la actividad resortiva de los osteoclastos, por lo que son utilizados en el tratamiento de pacientes con enfermedades que cursan con lisis ósea. A pesar de ser usados en clínica, no se conoce mucho sobre su efecto sobre otras células componentes del microambiente óseo. En este Seminario de Título se evaluó la acción de ibandronato y zoledronato midiendo cambios en la actividad de la vía Wnt (vía que está involucrada en la formación y remodelación de hueso) y la expresión de RANKL (citoquina que promueve la diferenciación y actividad de los osteoclastos) sobre las líneas celulares de linaje mesenquimático HS-5 y Saos-2. Se demostró que ambas líneas celulares responden modulando sus niveles de  $\beta$ -catenina activa, tanto a estímulos inhibitorios (DKK-1), así como también a estímulos activadores de la vía Wnt (Wnt3a y SB 216763). Ibandronato y zoledronato provocaron un aumento en los niveles de  $\beta$ -catenina activa junto con inducir su localización nuclear. Ambos bifosfonatos disminuyeron la expresión de RANKL. Zoledronato aumentó los niveles de  $\beta$ -catenina activa y disminuyó los de RANKL aun en células cuya vía Wnt se encuentra inhibida por DKK-1. En conjunto, estos resultados sugieren que ibandronato y zoledronato tienen un efecto en células mesenquimáticas de médula ósea cultivadas in vitro, activando la vía Wnt y disminuyendo la expresión de RANKL. De esta forma, los bifosfonatos favorecerían la diferenciación osteogénica de los precursores de osteoblastos en la médula ósea.

## 1.1 ABSTRACT

Bisphosphonates are a class of drugs that act by reducing the resorptive activity of osteoclasts, therefore they are used in the treatment of patients with lytic bone diseases. However, despite of their clinical use, not much is known about the effects on other cell components of the bone microenvironment. In this Seminar, the action of ibandronate and zoledronate was evaluated by measuring changes in the Wnt pathway activity (this pathway is involved in bone formation and remodeling) and expression of RANKL (cytokine that promotes the differentiation and activity of osteoclasts) on the mesenchymal lineage cell lines HS-5 and Saos-2. We demonstrate here that both cell lines respond modulating the levels of active  $\beta$ -catenin to both, inhibitory stimuli (DKK-1), as well as to stimuli which activate the Wnt pathway (Wnt3a and SB 216763). Ibandronate and zoledronate caused an increase in active  $\beta$ -catenin levels and promoted its nuclear localization. Both bisphosphonates decreased the expression of RANKL. Zoledronate increased the levels of active  $\beta$ -catenin and decreased RANKL even in cells whose Wnt pathway was being inhibited by DKK-1. Taken together, these results suggest that ibandronate and zoledronate have an effect on bone marrow mesenchymal cells cultured in vitro, activating the Wnt pathway and decreasing the expression of RANKL. Thus, it could be considered that bisphosphonates have an osteogenic differentiation-promoting effect on osteoblast precursor cells in the bone marrow.

## **2. INTRODUCCIÓN**

### **2.1. Metabolismo óseo**

El hueso está compuesto fundamentalmente por un depósito de matriz extracelular calcificada y el tejido óseo, el cual secreta esta matriz. El mantenimiento de la masa ósea depende del proceso de remodelación ósea. A nivel celular, este proceso involucra a los osteoblastos y a los osteoclastos. Los osteoblastos provienen del linaje mesenquimático, forman los depósitos de fosfato de calcio y regulan la señalización entre células del microambiente óseo. Por otra parte, los osteoclastos, derivan del linaje hematopoyético, poseen múltiples núcleos ya que se forman a partir de la fusión de macrófagos y tienen la capacidad de degradar la matriz ósea.

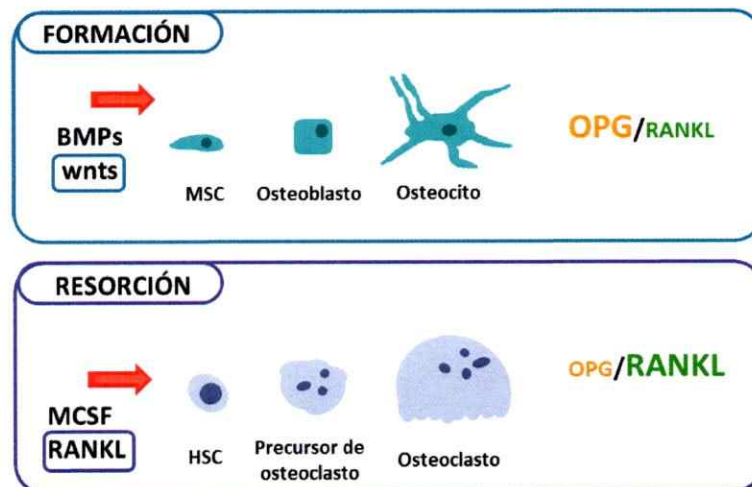
En la médula ósea se expresan factores proteicos que regulan la remodelación del hueso, los niveles relativos de estos factores determinan si en el hueso se ven favorecidos o no los procesos de formación o degradación. El ligando del receptor activador del factor nuclear  $\kappa$ -B (RANKL) se ha encontrado en aspirados de médula ósea, en la sangre y en las membranas de células de estroma de la médula ósea. Esta citoquina estimula la diferenciación, supervivencia y fusión de los precursores de osteoclastos y activa a los osteoclastos maduros. Por otra parte, osteoprotegerina (OPG), un factor soluble secretado también por células de estroma de la médula ósea, actúa como un receptor señuelo de RANKL y al unirse con éste lo neutraliza impidiendo su unión con el receptor RANK en los osteoclastos (Schoppet et al. 2002, Hofbauer et al. 2006, Edwards et al. 2008)(Figura 1).

### **2.2. Mieloma múltiple y remodelación ósea desregulada**

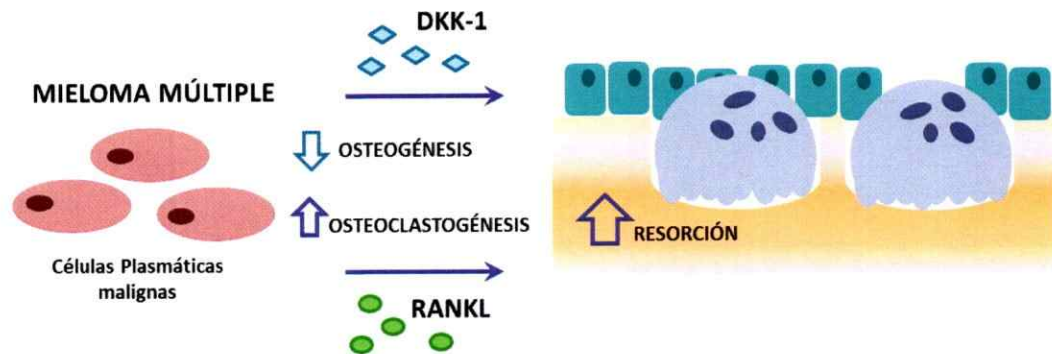
El mieloma múltiple es una neoplasia hematológica en la que células de mieloma (células plasmáticas malignas) se infiltran en la médula ósea. Se caracteriza

por el desarrollo de una enfermedad ósea progresiva asociada a dolor de hueso, fracturas patológicas, osteoporosis e hipercalcemia (Terpos y Dimopoulos 2005, Kyle y Rajkumar 2008). En el proceso de remodelación ósea de los pacientes con mieloma múltiple, la resorción y la formación de hueso se encuentran desacopladas; la degradación ósea mediada por osteoclastos se encuentra incrementada, y esta degradación está exacerbada aún más debido a una disminución en la formación de hueso por parte de los osteoblastos (Edwards et al. 2008), resultando finalmente en la pérdida de masa ósea (Figura 2).

Algunos estudios señalan que las células de mieloma expresan RANKL contribuyendo así a estimular la osteoclastogénesis. Por otro lado, otros reportes han demostrado que RANKL es expresado en células del estroma de la médula ósea y en osteoblastos, en su forma soluble y unida a membrana (Dalton 2003, Sezer et al. 2003) y que las células de mieloma estimulan la expresión de RANKL y suprimen la expresión de OPG por osteoblastos (Giuliani et al. 2001, Pearce et al. 2001)



**Figura 1. Componentes Celulares de la Remodelación Ósea.** Las células troncales mesenquimáticas (MSC) se diferencian en osteocitos, mientras que las células troncales hematopoyéticas dan origen a osteoclastos. Los niveles de proteínas wnt, OPG, RANKL, BMP y M-CSF entre otros factores dirigen los procesos de formación y resorción ósea. BMP: Bone morphogenetic protein; M-CSF: Macrophage Colony-Stimulating Factor.



**Figura 2. Resorción ósea en el mieloma múltiple.** Las células plasmáticas malignas infiltradas en la médula ósea alteran el metabolismo óseo aumentando la resorción ósea y disminuyendo la formación de hueso. DKK-1: Dickkopf 1; RANKL: Receptor Activator of Nuclear factor  $\kappa$ -B Ligand.

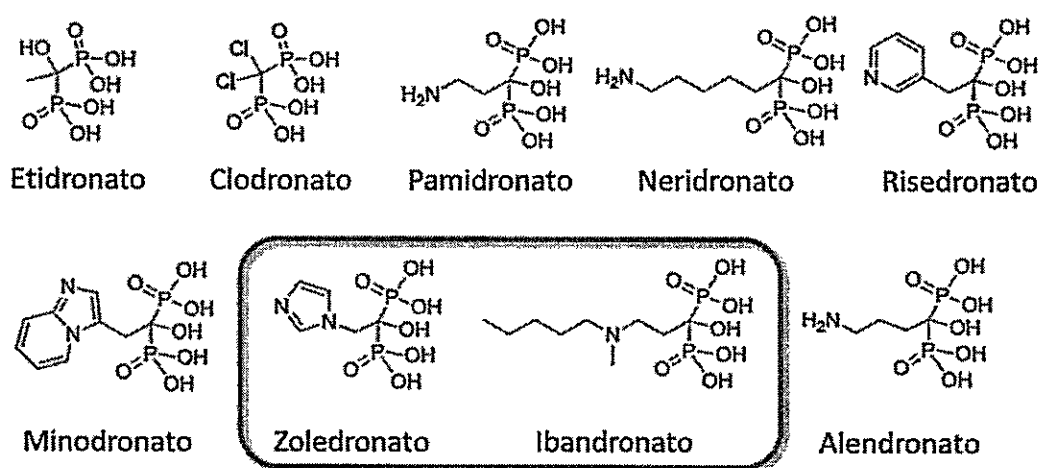
### 2.3. Bifosfonatos

Los bifosfonatos son fármacos utilizados en clínica para el tratamiento de enfermedades que involucran resorción ósea, tales como osteoporosis, enfermedad de Paget, cáncer de mama y de próstata con metástasis ósea y mieloma múltiple (Yeh y Berenson 2006, Aapro et al. 2008, Russell et al. 2008, Saad 2008). Los bifosfonatos ejercen su acción sobre los osteoclastos reduciendo su actividad o induciendo su apoptosis (Rogers 2004).

Los bifosfonatos son análogos sintéticos no hidrolizables de pirofosfato que en lugar de un átomo de oxígeno uniendo a los dos grupos fosfato, tienen un átomo de carbono (Figura 3); esta sustitución le confiere estabilidad a la molécula, haciéndola resistente a la degradación biológica y por lo tanto, no son metabolizados en el organismo y son excretados de forma inalterada (Russell et al. 2008).

Los bifosfonatos tienen una alta afinidad por el componente mineral de fosfato de calcio del hueso (Roelofs et al. 2006, Ebetino et al. 2011); por esta razón, luego de

su administración ya sea por vía intravenosa u oral, son rápidamente retirados de la circulación debido a que se unen a la matriz mineralizada en áreas de remodelación ósea activa (Lin 1996, Masarachia et al. 1996, Chen et al. 2002). Su adsorción en las superficies minerales los deja en contacto cercano con los osteoclastos, el blanco celular en que se han centrado los estudios acerca de su acción biológica. La selectividad de los bifosfonatos por el hueso, más que por otros tejidos, es una de las bases para su eficacia y seguridad en la medicina clínica.



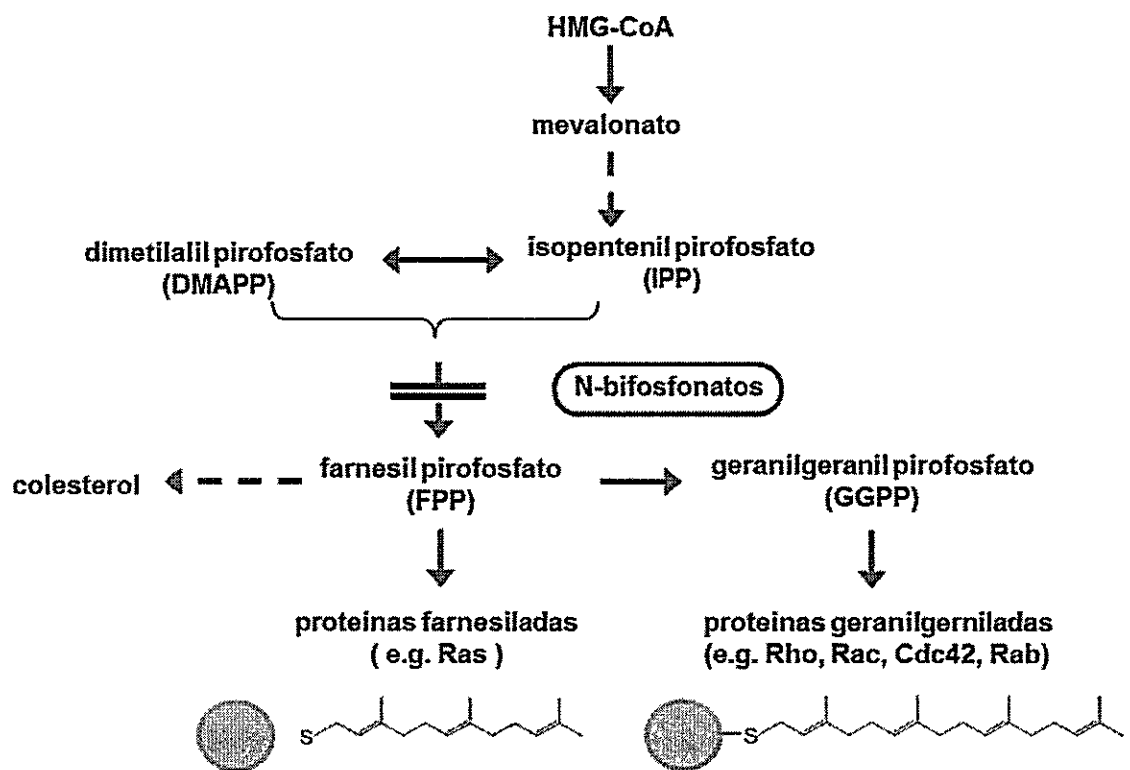
**Figura 3. Bifosfonatos utilizados en clínica.** Estructura química de los bifosfonatos usados clínicamente para el tratamiento y prevención de la osteólisis.

#### 2.4. Acción biológica de los bifosfonatos

Distintos estudios señalan que los bifosfonatos interfieren en el reclutamiento y diferenciación de los osteoclastos, inducen su apoptosis y afectan su actividad resortiva (Hughes et al. 1989, Ito et al. 1998, Green 2004). Éstos fármacos son internalizados por endocitosis junto con otros productos de la resorción, lo que se ha confirmado utilizando alendronato marcado radiactivamente o con fluorescencia; esta molécula se pudo localizar al interior de los osteoclastos dentro de vacuolas (Sato et al. 1991). Luego de ser internalizados, interfieren en procesos metabólicos intracelulares,

diferenciándose dos mecanismos. Los bifosfonatos más simples, que no contienen nitrógeno (etidronato y clodronato) pueden ser incorporados en análogos no hidrolizables de ATP; estas moléculas alteradas pueden interferir en vías de señalización dentro de la célula revocando eventualmente su muerte (Green 2004, Roelofs et al. 2006, Russell et al. 2008). Por otra parte, los bifosfonatos que contienen nitrógeno (pamidronato, alendronato, risendronato, ibandronato y zoledronato) inhiben enzimas de la vía biosintética del mevalonato/colesterol. La enzima blanco principal para este tipo de bifosfonato es la farnesil pirofosfato sintasa (FPPS)(Figura 4); la estructura cristalizada de esta proteína muestra que existe interacción entre el átomo de nitrógeno de la molécula de bifosfonato y residuos cercanos al sitio activo de la enzima (Ebetino et al. 2011). La inhibición de FPPS evita que se sinteticen compuestos isoprenoídes (farnesol y geranylgeraniol), moléculas que son requeridas para la prenilación postraduccional de proteínas que unen GTP (Ebetino et al. 2011)(Figura 4). Estas proteínas son esenciales para algunos eventos de señalización celular dentro de los osteoclastos, conducentes por ejemplo a la desorganización del citoesqueleto (Murakami et al. 1995) o a la formación del borde en cepillo, región de la membrana del osteoclasto con múltiples invaginaciones que participa directamente en la resorción ósea (Russell 2011). La captación de los bifosfonatos en el hueso y la liberación localizada de éstos durante la resorción osteoclástica explica porqué los bifosfonatos tendrían un efecto selectivo sobre los osteoclastos. Sin embargo esto no excluye la posibilidad que estas drogas sean internalizadas también por las células vecinas del estroma de la médula ósea, como los osteoblastos o células tumorales, particularmente luego de una administración repetitiva por períodos extensos de tiempo (Roelofs et al. 2010).

El efecto de los bifosfonatos ha sido estudiado in vitro en cultivos primarios de células osteoblásticas humanas, en los que se encontró que zoledronato y pamidronato incrementan la expresión de OPG (Viereck et al. 2002). Además, zoledronato modularía la expresión de RANKL en células de tipo osteoblásticas humanas al activar la enzima convertidora de TNF- $\alpha$  (TACE), la que corta RANKL de transmembrana (Pan et al. 2004); e Ibandronato Inhibe la expresión de RANKL en células mesenquimáticas del estroma de la médula ósea provenientes tanto de sujetos control como de pacientes con mieloma múltiple (Fernández et al. 2010).



**Figura 4. Diagrama de la vía del mevalonato.** Los bifosfonatos que contienen nitrógeno son inhibidores de la FPP sintasa, por lo que inhiben la síntesis de los metabolitos FPP y GGPP los que son requeridos para la prenilación de proteínas claves para la acción y sobrevivencia de los osteoclastos.



## 2.5. Vía Wnt en el metabolismo óseo

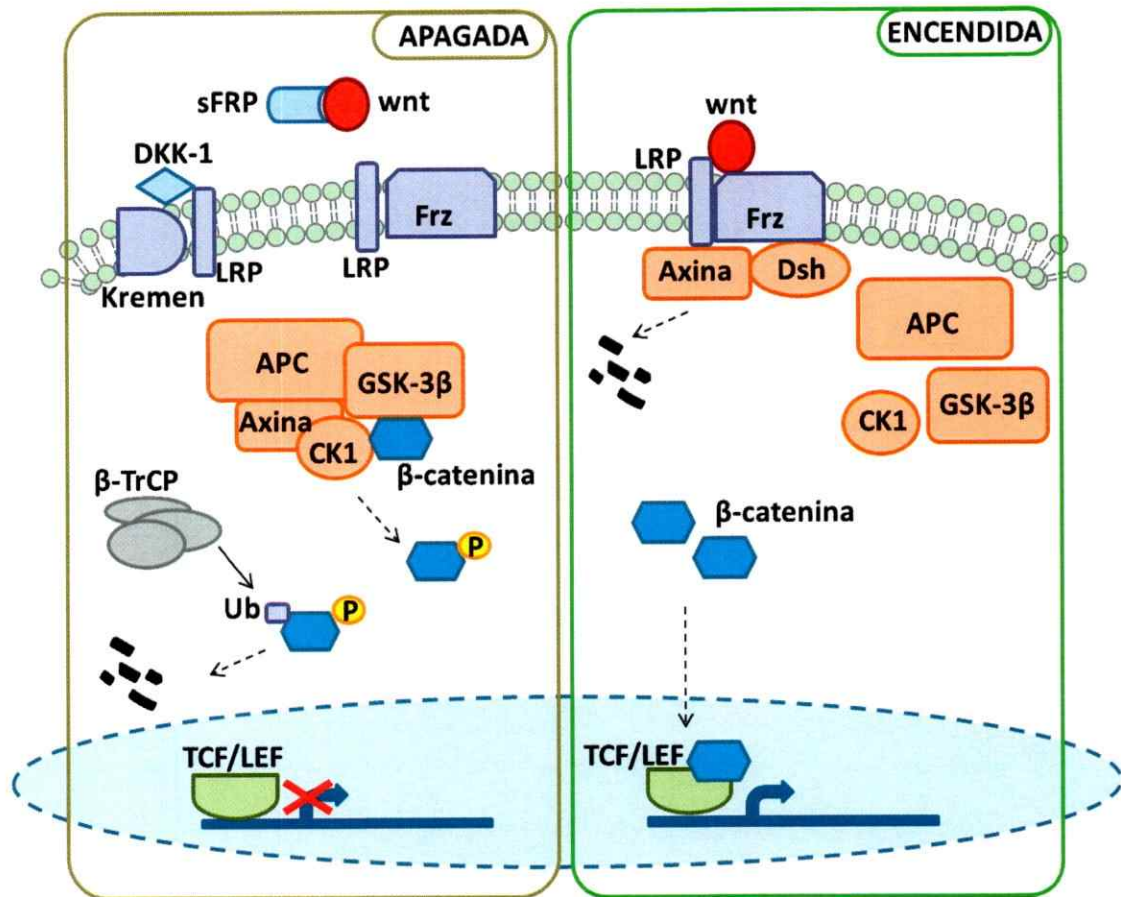
La vía de señalización Wnt tiene un rol en el desarrollo y mantención de distintos tejidos y órganos. En el tejido óseo en particular juega un rol central en el proceso de osteoblastogénesis (Hartmann 2006).

Las proteínas wnt son glico-lipoproteínas ricas en cisteína; se conoce que regulan el desarrollo, proliferación, diferenciación, y la generación de polaridad celular (Akiyama 2000, Huelsken y Birchmeier 2001).  $\beta$ -catenina es el componente clave en la señalización por la vía Wnt canónica.

En ausencia de ligando wnt,  $\beta$ -catenina es degradada por un complejo integrado por las proteínas adenomatosis polyposis coli (APC), axina, y glicógeno sintasa 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ). APC y axina funcionan como proteínas andamio que permiten que GSK3 $\beta$  fosforile a  $\beta$ -catenina; esta fosforilación es una señal para su degradación por la vía de ubiquitina/proteosoma mediada por  $\beta$ -TrCP (Ikeda et al. 1998, Liu et al. 2002).

Cuando un ligando wnt se une al receptor Frizzled (Frz) y a los correceptores low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6 (LRP5/6), Dishevelled (Dsh) se hiperfosforila por caseína quinasa (CK1), gana más afinidad por Frz y se ensambla el complejo LRP5/6-axina-FRAT(frequently rearranged in advanced T-cell lymphoma) lo que lleva a la degradación de axina (Ling et al. 2009), y como consecuencia  $\beta$ -catenina se disocia del complejo APC-axina-GSK3 $\beta$ . De forma alternativa, DSH interacciona con Axina y la actividad de GSK3 $\beta$  es inhibida,  $\beta$ -catenina no es degradada, se acumula en su forma activa no fosforilada y transloca al núcleo celular donde interacciona con los factores de transcripción T cell factor / lymphoid enhancer binding factor (TCF/LEF) para luego mediar efectos en la transcripción génica (Krishnan et al. 2006, Ling et al. 2009)(Figura 5).

## VÍA WNT CANÓNICA



**Figura 5. Diagrama de la vía de señalización Wnt.** En el estado apagado,  $\beta$ -catenina es fosforilada por GSK3- $\beta$  y luego es degradada en el proteosoma. En el estado encendido, la unión del ligando wnt al receptor Frz inhibe la actividad de GSK3- $\beta$ ,  $\beta$ -catenina se acumula y transloca al núcleo donde se une a TCF/LEF. APC: adenomatous polyposis coli; CK1: casein kinase 1; DKK-1: Dickkopf-1; Dsh: Dishevelled; Frz: Frizzled; GSK-3 $\beta$ : glycogen syntase kinase 3 beta; LRP: Low density lipoprotein receptor protein; sFRP: soluble Frizzled Related Protein; TCF/LEF: T-cell factor/lymphoid enhancer factor; Ub: Ubiquitina;  $\beta$ -TcCP: beta transducin repeat containing protein.

La señalización por la vía Wnt es regulada por antagonistas como los péptidos secretados relacionados a Frizzled (sFRPs), los que compiten con Frz por la unión de ligandos wnt; y Dickkopfs (DKKs), los que se unen a LRP5/6 previniendo la formación del complejo Frz-LRP, evitando que los ligando wnt activen la vía (Li et al. 2005), además, al interactuar DKK-1 con Kremen y LRP, se produce la internalización del complejo y de esta forma se disminuye el número de correceptores disponibles para señalizar (Mao et al. 2002).

Mutaciones de pérdida de función en el gen de LRP5, están asociadas al síndrome de osteoporosis-pseudoglioma, el cual se caracteriza por una baja densidad mineral del hueso (Gong et al. 2001). Por otra parte, una mutación en el N terminal (G171V) en el mismo gen, reduce la afinidad de LRP por DKK-1 y está asociada con el desarrollo de una mayor masa ósea (Boyden et al. 2002, Van Wesenbeeck et al. 2003, Ai et al. 2005). En modelos animales se pueden observar otras alteraciones en el metabolismo óseo, por ejemplo: ratones *Lrp5<sup>-/-</sup>* presentan un fenotipo de baja masa ósea debido a una proliferación reducida de las células precursoras de osteoblastos (Kato et al. 2002); además, ratones que sobreexpresan en sus osteoblastos la mutante de LRP5 G171V muestran un fenotipo que incluye una actividad osteoblástica aumentada, apoptosis disminuida y mayor masa ósea, similar al observado en humanos con esta mutación (Babij et al. 2003). Estudios en ratones *Sfrp<sup>-/-</sup>* deficientes en el inhibidor Wnt soluble sFRP1, presentan una mayor masa ósea; a partir de experimentos con células derivadas de la médula ósea de estos ratones, se ha sugerido que la activación de Wnt puede estimular la diferenciación y proliferación de osteoblastos (Bodine et al. 2004).

Conociendo que tanto la vía Wnt como los bifosfonatos tienen efecto en la expresión de genes relacionados con el metabolismo óseo, en este seminario de título se evaluó el efecto de bifosfonatos en la activación de la vía Wnt canónica y en la expresión de RANKL, en células HS-5 y Saos-2 del linaje mesenquimático.

## **2.6. Hipótesis**

Ibandronato y zoledronato activan la vía Wnt y disminuyen la expresión de RANKL en células de linaje mesenquimático de médula ósea.

### **Objetivo General**

Evaluar la acción de bifosfonatos sobre la vía de señalización Wnt y la expresión de RANKL en células mesenquimáticas.

### **Objetivos específicos**

- Detectar la expresión de los componentes de la vía de señalización Wnt en las líneas celulares HS-5 y Saos-2.
- Determinar niveles de  $\beta$ -catenina activa en respuesta a la acción de moduladores de la vía Wnt.
- Determinar si existen cambios en la acumulación de  $\beta$ -catenina activa y RANKL por efecto de bifosfonatos.
- Analizar la localización subcelular de  $\beta$ -catenina en respuesta al tratamiento con bifosfonatos.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Materiales**

##### **3.1.1. Equipos e instrumentos**

Campana de flujo laminar Class II Type A/B3 model nº NU-425-400, NUAIRE

Incubador a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> cámara de acero inoxidable, Heraeus HERAcCell

Cámaras de electroforesis y transferencia Bio-Rad

Centrifuga Heraeus Biofuge primo R

Microscopio invertido de contraste de fase NIKON TMS-F

Lector de absorbancia para microplacas TECAN Infinite F50

Cámara digital Nikon Coolpix 4500

Cámara de Neubauer Hirschmann

Microscopio confocal Zeiss LSM 510

pHmetro HI 111-01 Hanna Instruments

##### **3.1.2. Material biológico**

Línea celular de estroma de médula ósea humana HS-5, ATCC CRL-11882

Línea celular de osteosarcoma humano Saos-2, ATCC HTB-85

##### **3.1.3. Material de plástico**

Se utilizaron placas y botellas de cultivo NUNC, tubos de polipropileno Orange y Axygen.

##### **3.1.4. Reactivos para cultivo celular**

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), GIBCO

Minimum Essential Medium Alpha Medium ( $\alpha$ MEM), GIBCO

Agua bidestilada Sanderson

Suero fetal bovino (FBS), Hyclone

Penicilina - estreptomicina GIBCO

Tripsina Hyclone

### **3.1.5. Anticuerpos**

Anticuerpo policlonal de cabra anti IgG de ratón conjugado con Alexa fluor  $\text{\textcircled{R}}$  647,

Invitrogen

Anticuerpo monoclonal IgG de ratón anti  $\beta$ -catenina activa, Santa Cruz Biotechnology

Anticuerpo monoclonal IgG de ratón anti actina, Sigma

Anticuerpo monoclonal IgG de ratón anti RANKL, R&D Systems

Anticuerpo de cabra anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa, ROCKLAND

### **3.1.6. Proteínas recombinantes**

DKK-1 humano recombinante, R&D Systems

Wnt-3a humano recombinante, R&D Systems

### **3.1.7. Inhibidores de proteasas**

Aprotinina, Sigma-Aldrich

Leupeptina, US Biological

Pepstatina A, USBiological

Fluoruro de metilfenilsulfonilo (PMSF), Sigma

N-etilmaleimida (NEM), Sigma

### **3.1.8. Reactivos químicos**

Nonidet (NP-40), Sigma

Triton X-100, Winkler

Tween 20, Winkler

TEMED, Sigma

Azul de bromofenol, USBiological

Azul tripán, GIBCO

2-Mercaptoetanol, Merck

Deoxicolato de sodio (DOC), Sigma

Dimetilsofóxido (DMSO), Sigma

Dodecil sulfato de sodio (SDS), USBiological

Ácido etilendiamino tetraacético (EDTA), Sigma

Ácido Clorhídrico fumante 37% p.a., Merck

Glicerol, Winkler

Glicina, USBiological

Agarosa, Invitrogen

Cloroformo, Merck

2-propanol, Merck

Etanol absoluto, Merck

Formaldehído 37%, Merck

Metanol, TCL

### **3.1.9. Kits y otros**

Bondronat ®, ácido ibandronico, Roche

Zometa ®, zoledronato, Novartis

TRIzol® Reagent, Invitrogen

100bp DNA ladder, Fermentas

Prestained protein ladder, Fermentas

Solución acrilamida/bisacrilamida, Bio-Rad

Super Signal® West pico chemiluminiscent substrate, Thermo scientific

MTS, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, CellTiter 96® AQueous non-radiative cell proliferation assay, Promega

DC Protein Assay, Bio-Rad

SB 216763, inhibidor de GSK-3 $\beta$ , Sigma

transcriptasa reversa MMLV (Promega)

film de quimioluminiscencia Amersham Hyperfilm, GE Healthcare

Membranas de transferencia de PVDF, Thermo scientific

Medio para montaje fluorescente, DakoCytomation

### **3.1.10. Softwares**

Los films de revelado de inmunoblot y las fotografías digitales de geles de agarosa se analizaron con el software KODAK Molecular Imaging v. 4.0.5. La construcción de gráficos y análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism v.5.01.

## **3.2. Métodos**

### **3.2.1. Cultivo celular**

Las líneas celulares HS-5 y Saos-2 se cultivaron en D-MEM y  $\alpha$ MEM, respectivamente, ambos medios contenían 10% de FBS y los antibióticos penicilina



(100U/ml) y estreptomicina (100mg/ml). Los cultivos fueron mantenidos en un incubador a 37°C con ambiente húmedo y un 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.2.2. Evaluación de la viabilidad celular por ensayo MTS**

Se sembraron 5x10<sup>3</sup> células por pocillo en placas estériles de 96 pocillos y se dejaron adherir hasta el día siguiente. Posteriormente, las células se incubaron con ibandronato o zoledronato a concentraciones finales 1µM, 5µM, 10µM o 20µM o sin tratamiento con bifosfonato. Al cabo de 24 horas de incubación, se añadieron los reactivos MTS y PMS de acuerdo a las instrucciones del fabricante, se dejó reaccionar durante 1 hora y media y luego se registró la absorbancia a λ 490 nm. Se realizaron tres experimentos independientes.

### **3.2.3. Análisis por RT-PCR**

Se extrajo RNA total desde las células en cultivo utilizando TRIzol Reagent, el que se adicionó directamente sobre las células creciendo en las placas, luego las muestras se traspasaron a tubos Eppendorf y se almacenaron a -80°C. Las muestras se descongelaron y se añadió cloroformo, dejando el RNA en la fase acuosa, luego se precipitó con isopropanol y el pellet se lavó con etanol 70%. El RNA extraído se rehidrató, se determinó su concentración espectrofotométricamente y finalmente se conservó a -80°C para su posterior utilización. Alícuotas de las muestras de RNA se sometieron a transcripción reversa usando la enzima transcriptasa reversa MMLV para obtener cDNA. El cDNA se utilizó en reacciones de PCR con Taq polimerasa, utilizando partidores específicos para amplificación de genes de la vía Wnt canónica (Tabla 1). Las reacciones de PCR consistieron en una denaturación a 94°C por 5 minutos; seguido por 38 ciclos de: 94°C por 30 segundos, T *annealing* por 30 segundos

y extensión a 72 °C por 30 segundos; y una extensión final a 72 °C por 10 minutos. Los productos de PCR fueron cargados en geles de agarosa al 1% en buffer TAE con bromuro de etidio 0,2µg/ml, se observaron las bandas de DNA en un transiluminador UV y se obtuvieron fotografías digitales de los geles.

**Tabla 1.** Partidores y condiciones de las reacciones de PCR.

Gen	Secuencia	T. de annealing	Longitud (pb)
Irp5	Fwd: 5'- GTGTCGCCCACCTCACTGGC -3'	64 °C	356
	Rev: 5'- GTCCACACACTGACCCCGCG -3'		
Irp6	Fwd: 5'- AATACTGATGGCACTGGGAGACGAG -3'	65 °C	297
	Rev: 5'- AATAGGGCAAGCACAGCGAAGG -3'		
β-catenina	Fwd: 5'- GACATGGCCATGGAACCAGAC -3'	60 °C	325
	Rev: 5'- GATGAGCAGCATCAAACCTGTGTAG -3'		
gsk-3β	Fwd: 5'- CAGCAGCCTTCAGCTTTTGG -3'	57 °C	358
	Rev: 5'- CCGGAACATAGTCCAGCACCAG -3'		
frz2	Fwd: 5'- GGTGACCCAGCACTGCAAGAG -3'	56 °C	333
	Rev: 5'- CCTAAAAGTGAAATGGTTTTGATCG -3'		
tcf-1	Fwd: 5'- TGACCTCTCTGGCTTCTACT -3'	62 °C	240
	Rev: 5'- TTGATGGTTGGCTTCTTGGC -3'		
lef1	Fwd: 5'- CCAGCTATTGTAACACCTCA -3'	56 °C	421
	Rev: 5'- TTCAGATGTAGGCAGCTGTC -3'		

#### 3.2.4. Tratamiento con moduladores de la vía Wnt

Se sembraron  $2,5 \times 10^5$  células HS-5 o  $1,2 \times 10^5$  células Saos-2 en sus respectivos medios de crecimiento en placas estériles de 35 mm. Las células se dejaron adherir por 24 horas y luego se incubaron con Wnt3a humano recombinante a concentraciones finales de 50 ng/ml, 100 ng/ml y 200 ng/ml; con DKK-1 humano recombinante a concentraciones de 10 ng/ml, 20 ng/ml y 50 ng/ml; o con el inhibidor de

GSK-3 $\beta$ , SB216763, a concentraciones de 2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, y 20  $\mu$ M. Al cabo de 24 horas las células se lisaron y se analizó por inmunoblot su contenido de  $\beta$ -catenina activa y actina.

### **3.2.5. Tratamiento con bifosfonatos**

Se sembraron  $2,5 \times 10^5$  células HS-5 o  $1,2 \times 10^5$  células Saos-2 en sus respectivos medios de crecimiento en placas estériles de 35 mm y se incubaron con ibandronato o zoledronato a una concentración final de 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M o 20  $\mu$ M. Luego de transcurridas 6 horas o 24 horas de incubación, las células se lisaron y se evaluó el contenido de  $\beta$ -catenina activa y la expresión de RANKL por inmunoblot.

### **3.2.6. Reactivación de la vía Wnt por zoledronato**

Se sembraron  $2,5 \times 10^5$  células HS-5 o  $1,2 \times 10^5$  células Saos-2 en placas de 35mm en sus respectivos medios de crecimiento. Se ensayaron tres tratamientos con una duración de 24 horas: DKK-1 a una concentración final de 50  $\mu$ g/ml (DKK-1); DKK-1 a una concentración final de 50  $\mu$ g/ml durante 24 horas y zoledronato a una concentración 20  $\mu$ M añadido 6 horas antes de terminar el tratamiento (DKK-1 zol6); y DKK-1 (50  $\mu$ g/ml) y zoledronato (20  $\mu$ M) durante las 24 horas de tratamiento (DKK-1 zol24). Posteriormente las células se lisaron y se evaluó el contenido de  $\beta$ -catenina activa y la expresión de RANKL por inmunoblot.

### **3.2.7. Inmunoblot**

Se obtuvieron lisados de proteínas totales desde los cultivos celulares tratando las células con buffer de lisis RIPA (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 1%, deoxicolato de sodio 0,5%, 0,1% SDS) el que contenía inhibidores de proteasas

(2mM N-etil maleimida, fluoruro de metilfenilsulfonilo 100 µg/ml, leupeptina 10µg/ml, pepstatina 1 µg/ml, aprotinina 2 µg/ml). Los lisados se centrifugaron durante 10 minutos a 10.000 g para remover restos celulares. La concentración de proteína en los lisados se determinó con el kit DC Protein assay basado en el método de Lowry. Las proteínas se denaturaron en buffer sample (2% SDS, 2,5% β-mercaptoetanol, 0,002% azul de bromofenol, glicerol 10%, Tris – HCl 1M pH 6,8). Se cargaron 20 µg de proteínas totales por pocillo en SDS-PAGE al 10% y luego se transfirieron a membranas de PVDF, las membranas se bloquearon con leche descremada en polvo al 5% en TBS - Tween 20 0,1%, y posteriormente se incubaron toda la noche con agitación a 4°C con anticuerpos primarios monoclonales de ratón para β-catenina activa dilución 1:1.000, RANKL dilución 1:1.000, actina dilución 1:5.000, se lavó tres veces con TBS - Tween 20 0,1%, y luego se incubó con anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa en dilución 1:5.000 por una hora a temperatura ambiente y con agitación. Se reveló con West Pico Chemoluminiscent Substrate. Los análisis densitométricos se realizaron con el software KODAK Molecular Imaging v.4.0.5.

### **3.2.8. Inmunofluorescencia**

Se sembraron  $1 \times 10^4$  células Saos-2 sobre cubreobjetos redondos de 12 mm de diámetro en placas de 4 pocillos. Las células se trataron durante 24 horas, ya sea con DKK-1 a una concentración final de 50 ng/ml, o el inhibidor de GSK-3β SB216763 a una concentración final de 10 µM, o los bifosfonatos ibandronato o zoledronato, ambos a una concentración final de 20 µM. Posterior al tratamiento, se retiró el medio de cultivo, las células se lavaron con PBS - 1% BSA, luego se fijaron con formaldehído 3,7% durante 20 minutos, se retiró la solución de fijado y se permeabilizó con metanol

durante 10 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$ , se lavó nuevamente y se incubó durante toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  con anticuerpo monoclonal de ratón anti  $\beta$ -catenina activa en dilución 1:500. Posteriormente, se lavó dos veces y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad con anticuerpo secundario de cabra anti ratón Alexa Fluor 488 en dilución 1:500. Para teñir los núcleos se incubó con To-Pro-3 en dilución 1:500 durante 15 minutos, se lavó 5 veces y se montaron los cubreobjetos sobre portaobjetos con una gota de líquido de montaje fluorescente. Las muestras se observaron en microscopio de fluorescencia y se tomaron fotografías.

#### **3.2.9. Análisis estadístico**

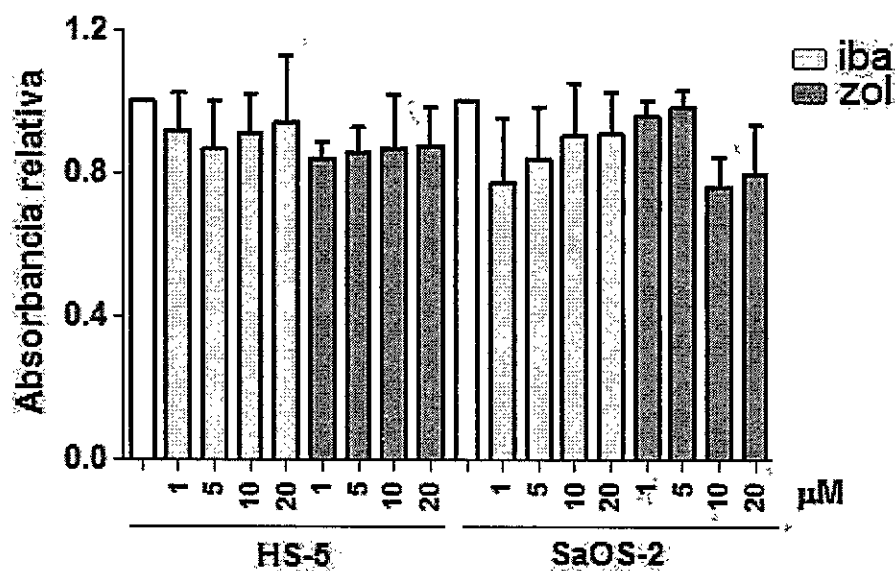
Se determinaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos por análisis de varianza (ANOVA) a un factor con post test de Tukey o post test de Dunnett cuando se compararon grupos con un grupo control. Se utilizó el software GraphPad Prism version 5.01. Un valor de  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Efecto de bifosfonatos en la viabilidad celular

Para descartar efectos de los bifosfonatos sobre la viabilidad de las células utilizadas, se midió la actividad de enzimas deshidrogenasas con un ensayo MTS como una medida de la viabilidad celular.

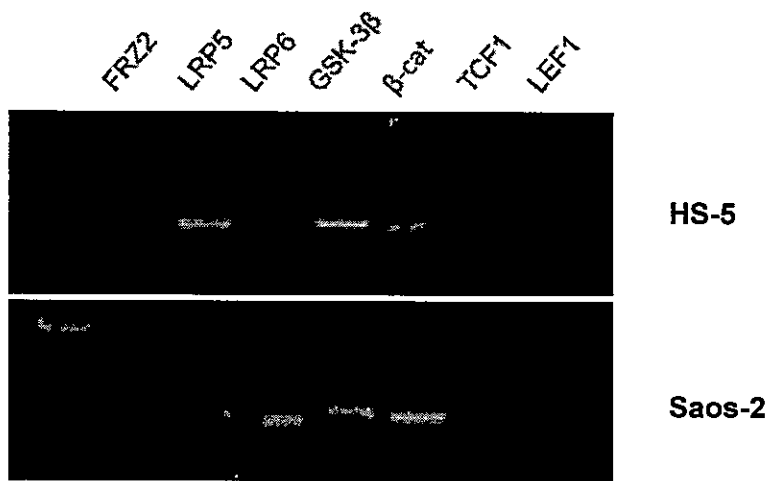
Como se muestra en la Figura 6, la viabilidad de las células HS-5 y Saos-2 no fue significativamente distinta entre las células del grupo control y las incubadas con zoledronato o Ibandronato a las concentraciones 1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M y 20  $\mu$ M al cabo de 24 horas de tratamiento.



**Figura 6. Efecto de bifosfonatos en la viabilidad celular.** Se evaluó mediante ensayo MTS, la viabilidad de células HS-5 y Saos-2 al cabo de 24 horas de incubación con ibandronato (iba) o zoledronato (zol) en distintas dosis. Los datos graficados representan la media  $\pm$  e.s.m. de la absorbancia relativa de cada grupo con respecto al grupo sin tratamiento.  $n=3$ . No se puede afirmar que existe diferencia significativa entre los grupos comparadas  $P>0,05$ .

#### 4.2. Las líneas celulares HS-5 y Saos-2 expresan componentes de la vía Wnt canónica

Las células HS-5 y Saos-2 expresan el RNA mensajero de los componentes de la vía Wnt para el receptor Frz2, los correceptores LRP5 y LRP6, la enzima GSK-3 $\beta$ , el cofactor transcripcional  $\beta$ -catenina y los factores de transcripción TCF1 y LEF1 (Figura 7).



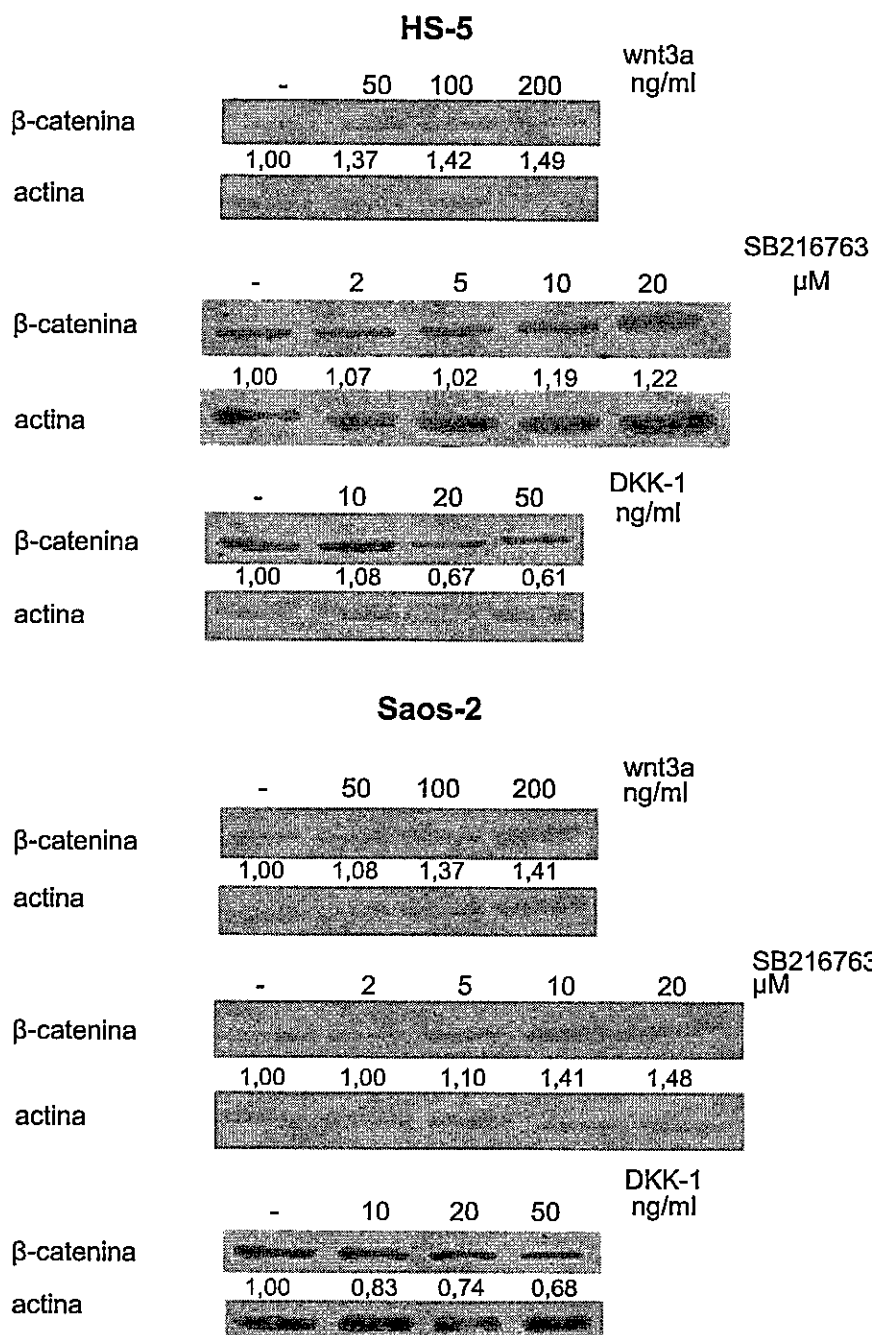
**Figura 7. HS-5 y Saos-2 expresan componentes de la vía Wnt.** Se extrajo RNA desde células HS-5 y Saos-2 y luego se detectó por RT-PCR la expresión del mRNA de los genes indicados en la figura.

#### **4.3. Acción de moduladores de la vía Wnt canónica: cambio en los niveles de $\beta$ -catenina activa**

Habiendo demostrado la expresión del mRNA de los componentes de la vía Wnt, se determinó la respuesta de células HS-5 y Saos-2 a moduladores de la actividad de esta vía analizando los niveles de  $\beta$ -catenina activa.

Los análisis por inmunoblot muestran que tanto Wnt3a, un ligando wnt canónico, así como SB 216763, inhibidor de GSK-3  $\beta$ , indujeron un aumento de  $\beta$ -catenina activa en ambas líneas celulares, luego de 24 horas de tratamiento. El efecto inverso se pudo observar en las células tratadas con DKK-1, antagonista de los correceptores LRP (Figura 8).





**Figura 8. Células HS-5 y Saos-2 responden a activadores e inhibidores de la vía Wnt canónica.** Las células se trataron durante 24 horas con wnt3a, SB216763 o DKK-1 en las concentraciones indicadas. Lisados celulares totales se sometieron a SDS-PAGE y se analizaron mediante inmunoblot con anticuerpos anti- $\beta$ -catenina activa y anti-actina. La figura muestra los inmunoblots de un experimento representativo

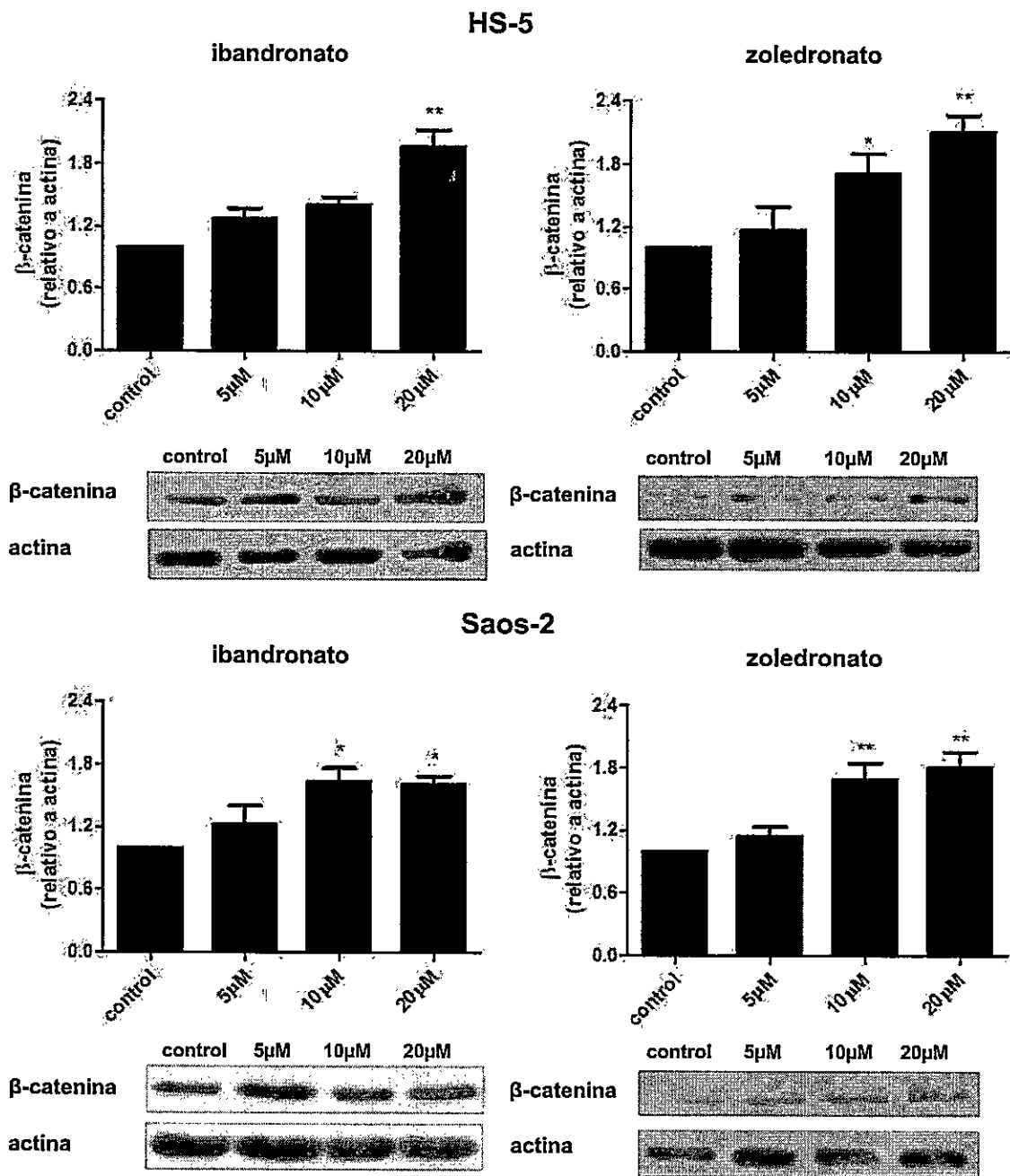
#### **4.4. Bifosfonatos aumentan los niveles de $\beta$ -catenina activa**

Se evaluó qué ocurre con la activación de la vía Wnt, midiendo la acumulación de  $\beta$ -catenina activa por inmunoblot.

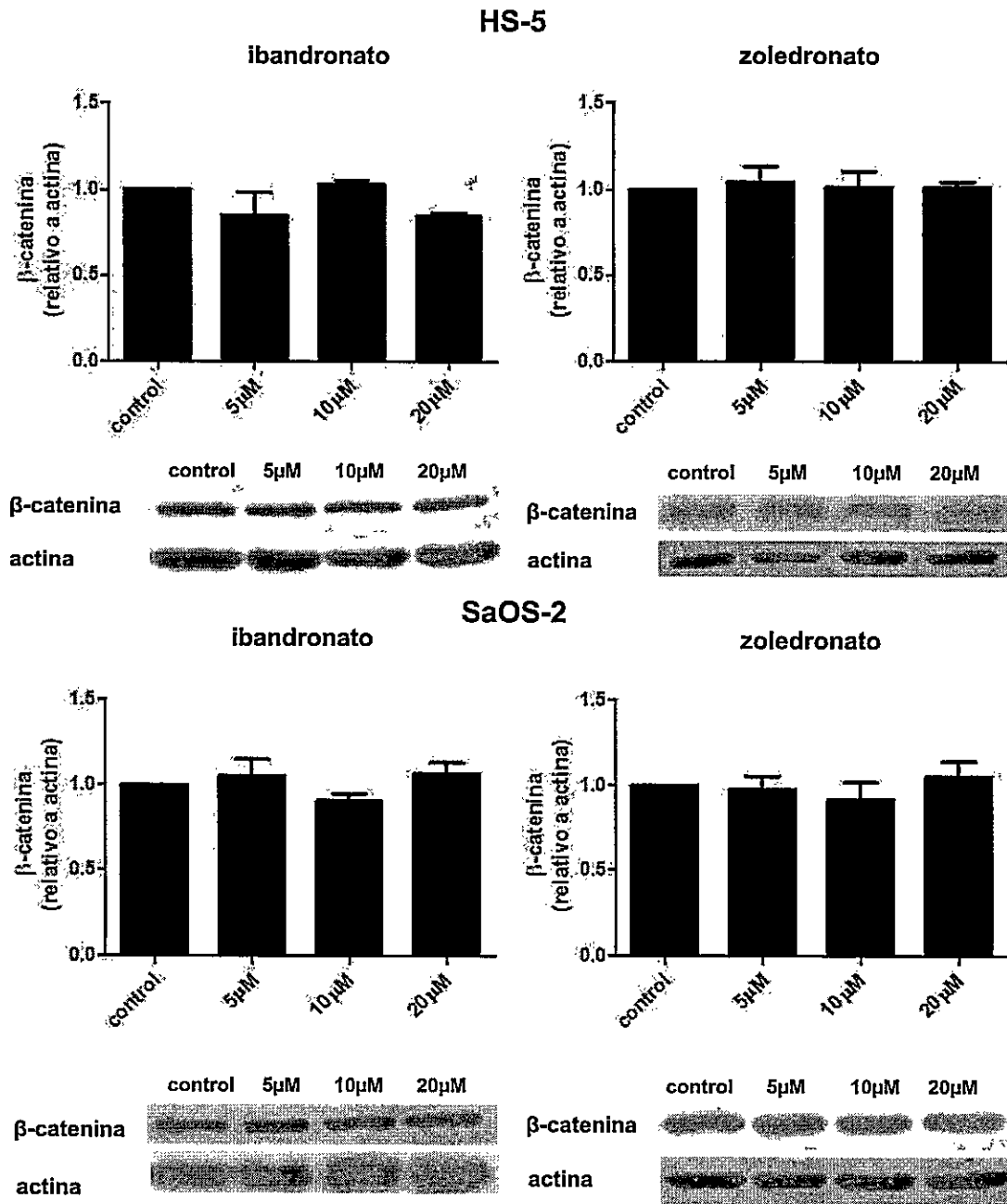
Las células HS-5 y Saos-2 aumentaron significativamente sus niveles de  $\beta$ -catenina activa cuando se trataron con ibandronato o zoledronato a las concentraciones 10  $\mu$ M y 20  $\mu$ M; pero, no se observó un cambio significativo con bifosfonato a concentración 5  $\mu$ M, esto al cabo de 6 horas de incubación (Figura 9).

Por otra parte, al cabo de 24 horas de tratamiento, la cantidad de  $\beta$ -catenina de las células tratadas con ambos bifosfonatos, no fue diferente a la del grupo de células sin tratamiento. Esta respuesta se obtuvo en ambas líneas celulares (Figura 10).

Este tipo de respuesta dentro de una ventana temporal es típica del mecanismo de acción de las vías de señalización, donde luego del estímulo, la vía vuelve a su estado basal.



**Figura 9. Bifosfonatos inducen la acumulación de β-catenina activa** Células HS-5 y Saos-2 se trataron con los bifosfonatos durante 6 horas a las concentraciones indicadas. Lisados celulares totales se sometieron a SDS-PAGE y se analizaron mediante inmunoblot con anticuerpos anti-β-catenina activa y anti-actina. Las bandas de β-catenina fueron cuantificadas por software densitométrico y normalizadas a actina. Los datos graficados representan el nivel de expresión media e.s.m con respecto al control. n=3; \*P< 0,05; \*\*P< 0,01.



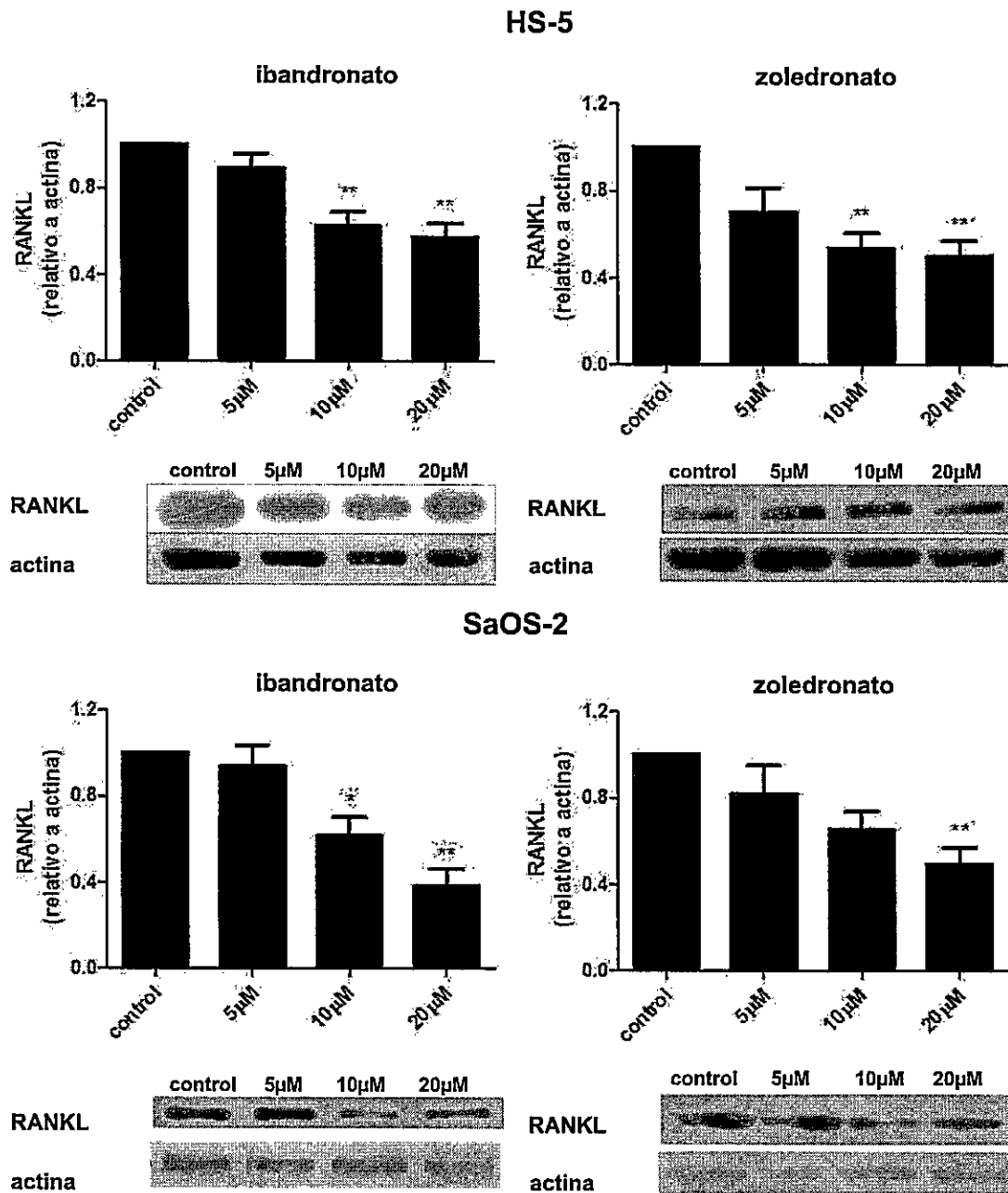
**Figura 10. Efecto de bifosfonatos sobre la acumulación de  $\beta$ -catenina activa.** Células HS-5 y Saos-2 se trataron con los bifosfonatos durante 24 horas a las concentraciones indicadas. Lisados celulares totales se sometieron a SDS-PAGE y se analizaron mediante inmunoblot con anticuerpos anti- $\beta$ -catenina activa y anti-actina. Las bandas de  $\beta$ -catenina fueron cuantificadas por software densitométrico y normalizadas a actina, los datos graficados representan el nivel de expresión media e.s.m con respecto al control.  $n = 3$ ; \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .

#### **4.5. Bifosfonatos disminuyen la expresión de RANKL**

Ya que ambos bifosfonatos tienen la capacidad de modificar los niveles de  $\beta$ -catenina activa, se evaluó si también pueden modificar la expresión de RANKL en estas células, ya que RANKL ha sido descrito como blanco de la vía Wnt y según resultados anteriores del laboratorio, ibandronato disminuye su expresión.

El tratamiento con ibandronato o zoledronato, a concentraciones 10  $\mu\text{M}$  y 20  $\mu\text{M}$  durante 24 horas, disminuyó la expresión de RANKL de forma significativa en las células HS-5 (Figura 11). Una respuesta similar se observó en las células Saos-2, al ser incubadas con ibandronato (a las concentraciones 10  $\mu\text{M}$  o 20  $\mu\text{M}$ ) o con zoledronato (20  $\mu\text{M}$ ) (Figura 11).

El aumento en la expresión de RANKL a las 24 horas de tratamiento con bifosfonatos, posterior al aumento de  $\beta$ -catenina a las 6 horas, se debería a que la expresión de RANKL es una respuesta río abajo de la acumulación de  $\beta$ -catenina en la vía de señalización Wnt.

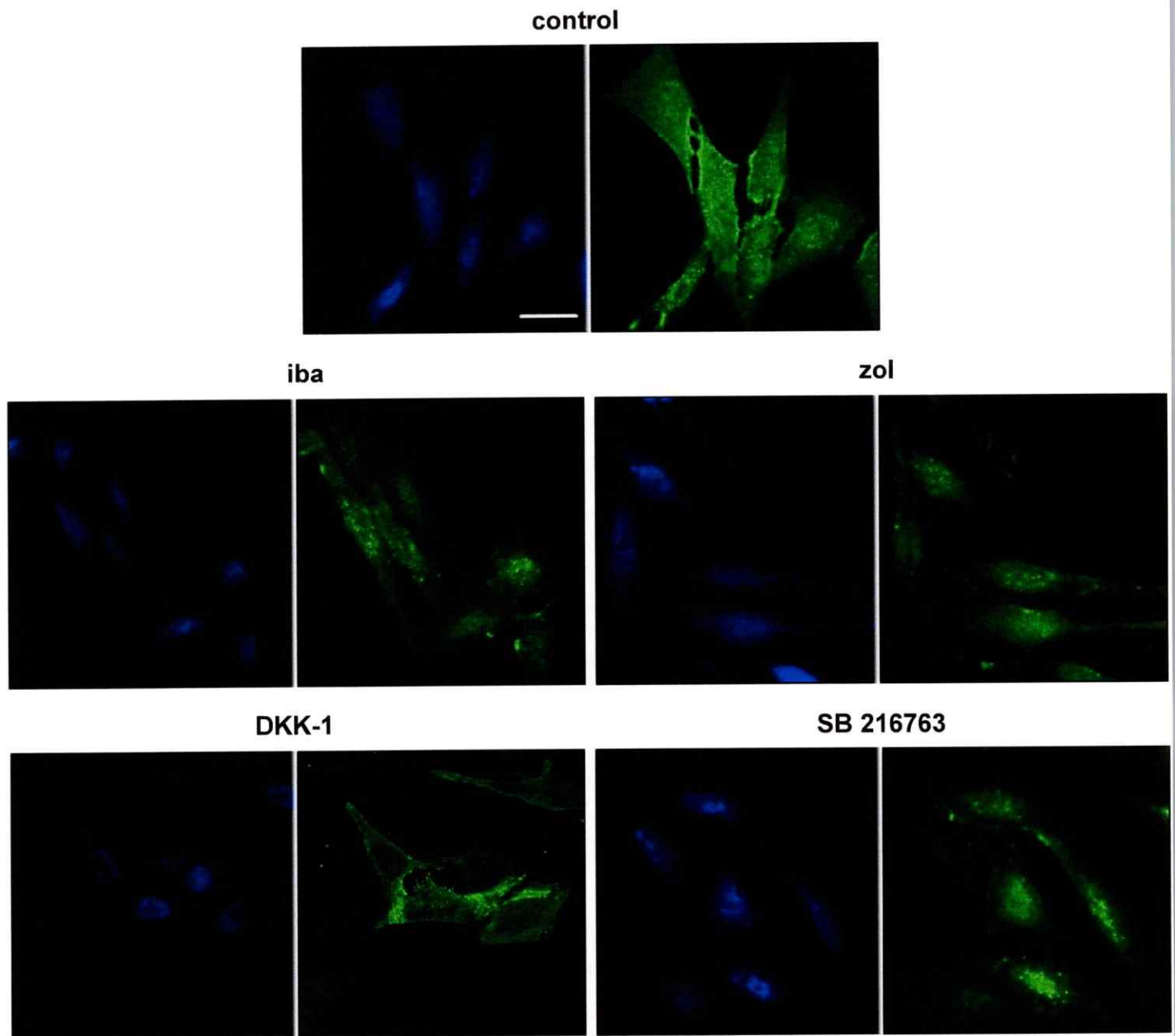


**Figura 11. Bifosfonatos reducen la expresión de RANKL.** Células HS-5 y Saos-2 se trataron con los bifosfonatos ibandronato y zoledronato durante 24 horas a las concentraciones indicadas. Lisados celulares totales se sometieron a SDS-PAGE y se analizaron mediante inmunoblot con anticuerpos anti-RANKL y anti-actina. Las bandas de RANKL fueron cuantificadas por software densitométrico y su intensidad normalizada a las de actina. Los datos graficados representan las medias  $\pm$  e.s.m comparadas con el control.  $n = 3$ ; \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .

#### **4.6. Bifosfonatos inducen la localización de $\beta$ -catenina en el núcleo celular**

La detección por inmunoblot de  $\beta$ -catenina activa demostró que la incubación con bifosfonatos produce cambios en el nivel de esta proteína luego de 6 horas, con respecto al de las células no tratadas (Figura 9), pero esta diferencia no se observó a las 24 horas (Figura 10).

Los resultados de la Figura 12 demuestran que al analizar  $\beta$ -catenina activa por inmunofluorescencia se observa fluorescencia concentrada en la región nuclear (zona indicada por la tinción con to-pro-3) en células tratadas por 24 horas en presencia de bifosfonatos o con un activador la vía Wnt (SB216763), lo que indicaría que la vía Wnt se mantiene activa hasta las 24 horas. En contraste las células sin tratamiento muestran una fluorescencia distribuida por toda la célula. Por otra parte, en células tratadas con DKK-1 se observa que la región del núcleo no presenta fluorescencia, sugiriendo que la vía Wnt está inhibida.



**Figura 12. Bifosfonatos inducen la acumulación nuclear de  $\beta$ -catenina.** Células Saos-2 se trataron por 24 horas con ibandronato 20 $\mu$ M (iba), zoledronato 20 $\mu$ M (zol), DKK-1 50 ng/ml (inhibidor de la vía Wnt), SB216763 5 $\mu$ M (activador de la vía Wnt). Se analizó por inmunofluorescencia la ubicación subcelular de  $\beta$ -catenina.  $\beta$ -catenina se muestra en verde (Alexa Fluor 488) y el núcleo celular se muestra en azul (To-Pro-3). Barra de magnificación 200 $\mu$ m.



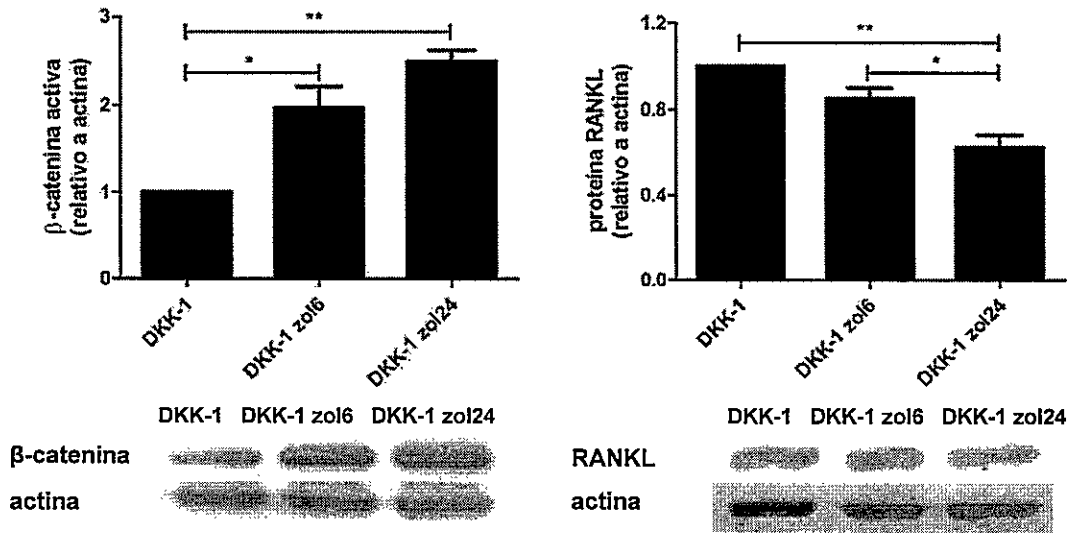
#### **4.7. El efecto de zoledronato sobre los niveles de $\beta$ -catenina y RANKL se antiene en células cuya actividad de la vía Wnt se encuentra inhibida por DKK-1**

Luego de determinar que DKK-1 disminuye los niveles de  $\beta$ -catenina activa (figura 8), se evaluó si zoledronato es capaz de producir un aumento en  $\beta$ -catenina cuando la vía Wnt se encuentra inhibida por DKK-1 a nivel de receptor.

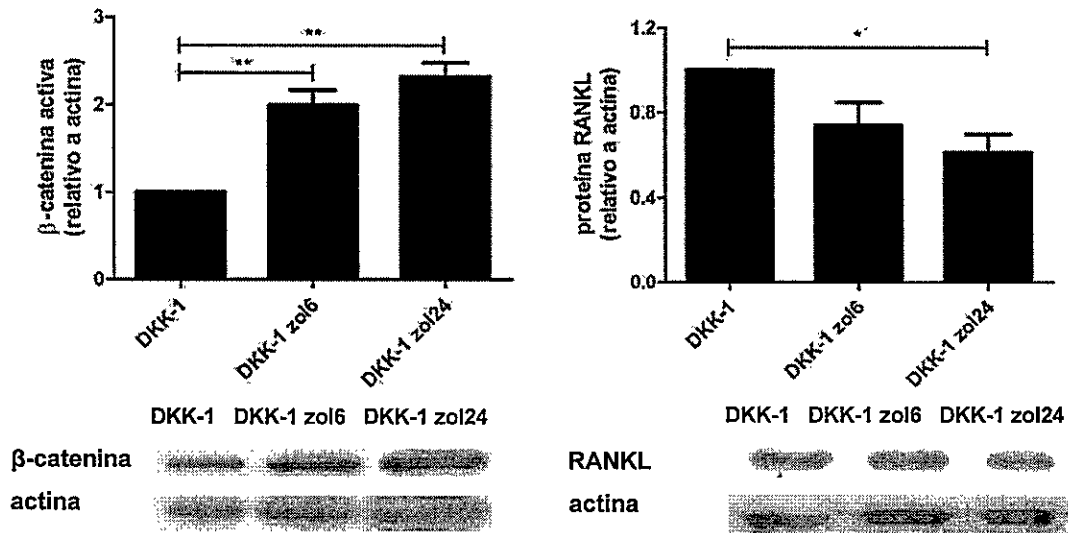
La incubación de las células con DKK-1 junto con zoledronato por 24 horas (DKK-1 zol24) aumentó los niveles de  $\beta$ -catenina activa de manera significativa en comparación al grupo tratado con DKK-1 solo. La incubación por las últimas 6 horas con bifosfonato (DKK-1 zol6) bastó para aumentar los niveles de  $\beta$ -catenina activa de manera significativa a pesar de que la vía estaba siendo inhibida por DKK-1 (Figura 13).

La incubación de las células con DKK-1 junto con zoledronato por 24 horas, disminuyó la expresión de RANKL de manera significativa en comparación a la expresión de RANKL de las células tratadas con DKK-1 solo. No obstante, las células incubadas con zoledronato por las últimas 6 horas, si bien disminuyeron sus niveles de RANKL, esta disminución no alcanzó a ser significativa con respecto al grupo tratado con DKK-1 solo.

### HS-5



### SaOS-2



**Figura 13. Efecto de zoledronato en presencia de DKK-1 sobre  $\beta$ -catenina y RANKL.** Células HS-5 y Saos-2 se trataron con DKK-1 (50  $\mu$ g/ml) durante 24 horas, con DKK-1 (50  $\mu$ g/ml) durante 24 horas y zoledronato (20 $\mu$ M) agregado a las 18 horas (DKK-1 zol6) o con DKK-1 (50  $\mu$ g/ml) más zoledronato (20 $\mu$ M) (DKK-1 zol24) durante 24 horas. Lisados celulares totales se sometieron a SDS-PAGE y se analizaron mediante inmunoblot con anticuerpos anti- $\beta$ -catenina activa, anti RANKL y anti-actina. Las bandas fueron cuantificadas por software densitométrico y normalizadas a actina. Los datos graficados representan el nivel de expresión con respecto al valor del grupo DKK-1. n=3; \*P<0,05; \*\*P<0,01.

## 5. DISCUSIÓN

Los bifosfonatos se usan frecuentemente en clínica para el tratamiento de enfermedades que cursan con lesiones osteolíticas, debido a su reconocida acción anti-resortiva sobre los osteoclastos. Sin embargo, se conoce poco respecto de la acción de estos compuestos sobre las células mesenquimáticas de la médula ósea, a pesar de que estas células estarían también expuestas a estos fármacos en el microambiente óseo. Es por esto que es de interés analizar si este tipo de compuestos modifican la actividad de células del linaje mesenquimático.

Antecedentes recientes indican que los bifosfonatos, además de su acción sobre los osteoclastos, podrían afectar a las células mesenquimáticas al menos por dos flancos; por un lado, afectarían la expresión de RANKL, una citoquina que favorece la resorción ósea (Pan et al. 2004, Fernández et al. 2010); y por otro, la diferenciación de precursores osteoblásticos, aumentando la expresión de marcadores osteogénicos y de mineralización (Im et al. 2004, Kim et al. 2009, Xiong et al. 2009, Wang y Stern 2011). Por otra parte, es conocido que la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina regula la osteogénesis (Hartmann 2006, Krishnan et al. 2006, Ling et al. 2009) y la expresión de RANKL en osteoblastos y sus precursores (Spencer et al. 2006, Fujita y Janz 2007). Dados estos antecedentes quisimos estudiar si los bifosfonatos tienen un efecto en la activación de la vía de señalización Wnt, algo que hasta ahora no ha sido establecido. En este seminario de título se logró determinar que los bifosfonatos ibandronato y zoledronato disminuyen la expresión de RANKL e inducen una acumulación de  $\beta$ -catenina activa, más aun, este efecto se mantiene cuando la vía Wnt se encuentra inhibida por DKK-1.

El efecto de los bifosfonatos sobre la viabilidad y proliferación de células osteoblásticas ha sido descrito en distintos trabajos con resultados que parecen contradictorios. Esto se debe a que se utilizaron distintos tipos celulares, en distintas condiciones de cultivo y a distintas concentraciones de bifosfonatos. Se podría establecer que, en general ocurre un aumento de la proliferación a concentraciones de bifosfonato de  $10^{-9}$  a  $10^{-6}$  M (Im et al. 2004, von Knoch et al. 2005, Xiong et al. 2009), mientras que los efectos inhibitorios aparecen a concentraciones mayores a  $10^{-6}$  M con un aumento en la proporción de células apoptóticas (Reinholz et al. 2000, Mackie et al. 2001, Wang y Stern 2011). Utilizando concentraciones de bifosfonatos del orden de  $10^{-6}$  M y al cabo de 24 horas de incubación, zoledronato e ibandronato no alteraron la viabilidad celular según los resultados obtenidos en este seminario de título,

En relación a la concentración de bifosfonato a la que las células osteoblásticas estarían expuestas *in vivo*, algunos autores señalan que, por ejemplo, la concentración de alendronato en sitios de resorción sería mayor a  $800 \mu\text{M}$  (Sato et al. 1991) y que en sitios cercanos a un tumor en el hueso la concentración sería de  $10 - 30 \mu\text{M}$  (Usui 1997). Por otra parte, luego de una infusión intravenosa de zoledronato de 4 mg en 100 ml durante 15 minutos, la concentración que se alcanzaría en el suero sería de  $1-2 \mu\text{M}$  (Chen et al. 2002, Ebert et al. 2009) y debido a la alta afinidad de los bifosfonatos por el hueso, la concentración a la que se exponen los osteocitos *in vivo* es probablemente mayor a la concentración sistémica de bifosfonatos que puede durar entre 3 a 6 horas (Ebert et al. 2009).

Antecedentes de la literatura relativos a las líneas celulares utilizadas en este trabajo señalan que ibandronato interfiere en la señalización por la vía MEK/ERK (Fernández et al. 2010) en células HS-5; mientras que, se ha comprobado que las células Saos-2 poseen una vía Wnt funcional (Qiang et al. 2008a, Qiang et al. 2008b).

Asimismo se ha descrito en células Saos-2, que bifosfonatos disminuyen la invasividad e inhiben la expresión de metaloproteinasas de matriz (Xin et al. 2009) y de sialoproteína de hueso (Chaplet et al. 2004).

Utilizando RT-PCR, demostramos que las células HS-5 y Saos-2 expresan el mRNA de los receptores y componentes necesarios para señalizar por la vía Wnt canónica. La expresión de algunos de los componentes de la vía ha sido descrita en las células Saos-2 (Qiang et al. 2008a, Qiang et al. 2008b), pero no en las HS-5. Demostramos también que estas células son capaces de transducir la señal hasta, al menos, aumentar sus niveles de  $\beta$ -catenina activa. Al tratar con wnt3a recombinante las células respondieron aumentando sus niveles de  $\beta$ -catenina activa; así mismo al tratar las células con SB216763, inhibidor de GSK3 $\beta$ , los niveles de  $\beta$ -catenina activa aumentaron; este efecto también ha sido descrito en células de músculo liso de bronquio humano (Gosens et al. 2010). Al tratar con DKK-1, un inhibidor de la vía Wnt cuya concentración en sangre se correlaciona con el estado de avance de la enfermedad ósea en pacientes con mieloma múltiple (Kaiser et al. 2008), se redujo la acumulación de  $\beta$ -catenina activa; este resultado está de acuerdo con lo reportado en células Saos-2, hFOB 1.19 y C2C12 (Qiang et al. 2008a). En conjunto estas observaciones sustentan que Saos-2 y HS-5 son capaces de responder a estímulos que modulan la actividad de la vía Wnt y que por lo tanto, la vía es funcional en estas células.

Los resultados por inmunoblot indicaron que ibandronato y zoledronato aumentan de manera transitoria los niveles de  $\beta$ -catenina activa; a las 6 horas de incubación aumentaron, pero al cabo de 24 horas no fueron diferentes a los del grupo sin tratamiento (Figura 8 y 9). Por otra parte, considerando los resultados de la localización subcelular de  $\beta$ -catenina activa por inmunofluorescencia, se puede concluir

que la vía Wnt todavía estaría activa al menos hasta las 24 horas de tratamiento con bifosfonatos. Más aún, el mismo efecto se obtuvo al estimular las células con SB216763, activador de la vía. Esta es la primera vez que se reporta que ibandronato y zoledronato aumentan el nivel de  $\beta$ -catenina y promueven su traslocación al núcleo, por lo que podrían actuar como activadores de la vía Wnt canónica.

Por otra parte DKK-1, inhibidor de los correceptores LRP5/6, provoca que  $\beta$ -catenina no transloque al núcleo (figura 7), situación que podría ocurrir en las células de la médula ósea de pacientes con mieloma múltiple, o en la artritis reumatoidea (Kaiser et al. 2008, Wang et al. 2011). Puesto que el efecto de zoledronato sobre  $\beta$ -catenina se detecta en células tratadas con DKK-1, su acción sería independiente de la activación de los correceptores LRP5/6 (figura 13).

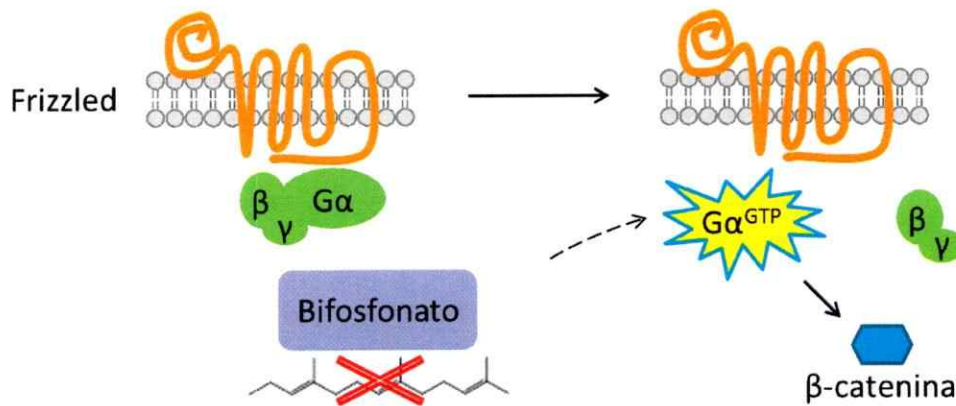
En este seminario de título también evaluamos si ibandronato o zoledronato inducen cambios en la expresión de RANKL; se encontró que ambos ejercen un efecto directo en las células HS-5 y Saos-2 provocando una disminución de la expresión de esta citoquina (Figura 10). Datos de la literatura muestran que la activación de la vía Wnt disminuye la expresión de RANKL (Spencer et al 2006). Por lo tanto, el efecto de zoledronato sobre la expresión de RANKL podría estar mediado por la activación de la vía Wnt. Más aún, en células tratadas con zoledronato y DKK-1, la expresión de RANKL es menor que en células tratadas con DKK-1 solo (Figura 13), lo que también apoya que su acción sería independiente de los correceptores LRP5/6.

En la literatura se pueden encontrar otras evidencias que apoyan el efecto de los bifosfonatos sobre células no osteoclásticas. Células osteoblásticas derivadas de ratones tratados con incadronato, pamidronato o alendronato inhiben la diferenciación *in vitro* de precursores de osteoclastos a osteoclastos maduros (Nishikawa et al. 1996); así mismo, medio condicionado por células osteoblásticas tratadas con bifosfonato

inhiben la formación y actividad de osteoclastos *in vitro*. (Nishikawa et al. 1996, Vitté et al. 1996). Además bifosfonatos disminuyen la expresión de RANKL, y aumentan la expresión de OPG en células osteoblásticas humanas (Viereck et al. 2002, Pan et al. 2004, Fernández et al. 2010). Si la disminución de la expresión de RANKL observada en estos experimentos *in vitro*, se replicara en el microambiente de la médula ósea, el efecto antiresortivo de los bifosfonatos estaría potenciado, ya que, además de la acción directa sobre los osteoclastos, los bifosfonatos provocarían la disminución de los niveles de RANKL producidos por células mesenquimáticas, contribuyendo a disminuir la osteólisis.

No existen reportes en la literatura acerca del efecto de los bifosfonatos sobre la activación de la vía Wnt. Basándonos en evidencias experimentales obtenidas en otros tipos celulares, especulamos que la acumulación de  $\beta$ -catenina activa por efecto de bifosfonatos podría resultar de la activación de proteínas G triméricas. Los bifosfonatos, como inhibidores de la farnesil pirofosfato sintasa, impiden la síntesis de farnesil pirofosfato (FPP) y geranilgeranil pirofosfato (GGP). Estos metabolitos son requeridos para modificaciones postraduccionales (prenilaciones) de algunas proteínas (Figura 4), predominantemente proteínas de señalización como GTPasas pequeñas, subunidades de proteínas G heterotriméricas, subunidades de fosfodiesterasas y lamininas nucleares (Zhang y Casey 1996, Dunford et al. 2006). Más aun, estudios recientes sugieren que las GTPasas no preniladas que se acumulan luego de la exposición de células a bifosfonatos nitrogenados, lo hacen en su estado activo (unido a GTP) (Dunford et al. 2006). Por otra parte, ya que los receptores Frizzled están estructuralmente relacionados a los receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas ( $G_{\alpha\beta\gamma}$ ), algunos autores proponen que proteínas G participan en la señalización por la vía Wnt canónica (Liu et al. 2001, Katanaev et al. 2005, Liu et al.

2005). Interesantemente, la subunidad  $\alpha$  de las proteínas G heterotriméricas es homóloga a las GTPasas pequeñas de la familia Ras, lo que permitiría proponer que la activación de la vía Wnt por acción de los bifosfonatos podría estar mediada por la activación de proteína  $G_{\alpha}$ . De acuerdo a esta propuesta, los bifosfonatos no requieren al receptor LRP-Frz, lo que estaría en concordancia con que zoledronato aumenta los niveles de  $\beta$ -catenina aun cuando el receptor está inhibido.



**Figura 14. Posible mecanismo de activación de la vía Wnt por bifosfonatos.** Bifosfonatos inhiben a la farnesil pirofosfato sintasa, lo que induce la acumulación de  $G_{\alpha}$  no prenilada y en estado activo.  $G_{\alpha}$  induce la estabilización de  $\beta$ -catenina.

La relevancia de que los bifosfonatos activen la vía Wnt radica en que esta vía es fundamental para el desarrollo de las células del hueso. En células pluripotentes de ratón, la vía Wnt promueve la osteoblastogénesis, aumentando la expresión de RUNX2, Dlx5 y osterix, (Bennett et al. 2005, Gaur et al. 2005) y en células mesenquimáticas humanas, la activación de la vía Wnt canónica favorece la formación de hueso (Gong et al. 2001, de Boer et al. 2004, Qiu et al. 2007).



Es necesario tener en cuenta que la actividad de la vía Wnt también depende del estado de desarrollo y estado de diferenciación de las células. En células comprometidas a linaje osteogénico, la señalización por la vía canónica estimula su diferenciación, mientras al mismo tiempo, inhibe la diferenciación terminal de los osteoblastos maduros (Kahler et al. 2006, Eijken et al. 2008, Kahler et al. 2008). La línea HS-5 tiene un estado menos comprometido que la línea Saos-2 hacia el linaje osteoblástico, sin embargo no se observaron diferencias entre la respuesta de ambas tipos de células a los bifosfonatos utilizados.

En los modelos actuales de terapias para enfermedades óseas, los bifosfonatos son compuestos interesantes, y pueden ser atractivos para usos en biotecnología. Recientemente se han desarrollado recubrimientos biocompatibles para prótesis óseas que incluyen a estos compuestos (Houshmand et al. 2007, Wermelin et al. 2008, Miettinen et al. 2009, Harding et al. 2010, Linderbäck et al. 2010). Es probable que la elaboración de estos materiales biocompatibles permita que los bifosfonatos se liberen directamente en el hueso afectado permitiendo el uso de dosis menores.

Los experimentos realizados en este seminario de título revelan que los bifosfonatos tienen un efecto en las células osteoblásticas regulando la expresión de RANKL, aumentando los niveles de  $\beta$ -catenina activa y promoviendo su translocación al núcleo. Este efecto no se ha descrito anteriormente. Los datos en conjunto sugieren que la disminución de RANKL es producido por la acumulación de  $\beta$ -catenina, y se especula que esto estaría mediado por la activación de la subunidad  $\alpha$  de proteínas G triméricas, representando una nueva acción celular de los bifosfonatos.

## 6. CONCLUSIONES

Ibandronato y zoledronato tienen un efecto en células mesenquimáticas de médula ósea cultivadas in vitro activando la vía Wnt y disminuyendo la expresión de RANKL. Estos efectos favorecerían la diferenciación osteogénica de las células precursoras de osteoblastos en la médula ósea.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Aapro M, Abrahamsson PA, Body JJ, et al.** (2008). Guidance on the use of bisphosphonates in solid tumours: recommendations of an international expert panel. *Annals of Oncology* 19: 420-432.
- Ai M, Holmen SL, Van Hul W, et al.** (2005). Reduced Affinity to and Inhibition by DKK1 Form a Common Mechanism by Which High Bone Mass-Associated Missense Mutations in LRP5 Affect Canonical Wnt Signaling. *Mol. Cell. Biol.* 25: 4946-4955.
- Akiyama T** (2000). Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Cytokine & growth factor reviews* 11: 273-282.
- Babij P, Zhao W, Small C, et al.** (2003). High Bone Mass in Mice Expressing a Mutant LRP5 Gene. *Journal of Bone and Mineral Research* 18: 960-974.
- Bennett CN, Longo KA, Wright WS, et al.** (2005). Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 3324-3329.
- Bodine PVN, Zhao W, Kharode YP, et al.** (2004). The Wnt Antagonist Secreted Frizzled-Related Protein-1 Is a Negative Regulator of Trabecular Bone Formation in Adult Mice. *Molecular Endocrinology* 18: 1222-1237.
- Boyden LM, Mao J, Belsky J, et al.** (2002). High Bone Density Due to a Mutation in LDL-Receptor-Related Protein 5. *New England Journal of Medicine* 346: 1513-1521.
- Chaplet M, Detry C, Deroanne C, et al.** (2004). Zoledronic acid up-regulates bone sialoprotein expression in osteoblastic cells through Rho GTPase inhibition. *Biochem. J.* 384: 591-598.
- Chen T, Berenson J, Vescio R, et al.** (2002). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of zoledronic acid in cancer patients with bone metastases. *The Journal of Clinical Pharmacology* 42: 1228-1236.
- Dalton WS** (2003). The tumor microenvironment: focus on myeloma. *Cancer treatment reviews* 29: 11-19.
- de Boer J, Wang HJ y van Blitterswijk C** (2004). Effects of Wnt Signaling on Proliferation and Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Engineering* 10: 393-401.
- Dunford JE, Rogers MJ, Ebetino FH, et al.** (2006). Inhibition of Protein Prenylation by Bisphosphonates Causes Sustained Activation of Rac, Cdc42, and Rho GTPases. *Journal of Bone and Mineral Research* 21: 684-694.
- Ebert R, Zeck S, Krug R, et al.** (2009). Pulse treatment with zoledronic acid causes sustained commitment of bone marrow derived mesenchymal stem cells for osteogenic differentiation. *Bone* 44: 858-864.
- Ebetino FH, Hogan A-ML, Sun S, et al.** (2011). The relationship between the chemistry and biological activity of the bisphosphonates. *Bone* 49: 20-33.

- Edwards CM, Zhuang J y Mundy GR (2008).** The pathogenesis of the bone disease of multiple myeloma. *Bone* 42: 1007-1013.
- Eijken M, Meijer IMJ, Westbroek I, et al. (2008).** Wnt signaling acts and is regulated in a human osteoblast differentiation dependent manner. *Journal of Cellular Biochemistry* 104: 568-579.
- Fernández M, Pino AM, Figueroa P, et al. (2010).** The increased expression of receptor activator of nuclear- $\kappa$ B ligand (RANKL) of multiple myeloma bone marrow stromal cells is inhibited by the bisphosphonate ibandronate. *Journal of Cellular Biochemistry* 111: 130-137.
- Fujita K y Janz S (2007).** Attenuation of WNT signaling by DKK-1 and -2 regulates BMP2-induced osteoblast differentiation and expression of OPG, RANKL and M-CSF. *Mol Cancer* 6: 71.
- Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, et al. (2005).** Canonical WNT Signaling Promotes Osteogenesis by Directly Stimulating Runx2 Gene Expression. *Journal of Biological Chemistry* 280: 33132-33140.
- Giuliani N, Bataille R, Mancini C, et al. (2001).** Myeloma cells induce imbalance in the osteoprotegerin/osteoprotegerin ligand system in the human bone marrow environment. *Blood* 98: 3527-3533.
- Gong Y, Slee RB, Fukai N, et al. (2001).** LDL Receptor-Related Protein 5 (LRP5) Affects Bone Accrual and Eye Development. *Cell* 107: 513-523.
- Gosens R, Baarsma HA, Heijink IH, et al. (2010).** De novo synthesis of  $\beta$ -catenin via H-Ras and MEK regulates airway smooth muscle growth. *The FASEB Journal* 24: 757-768.
- Green JR (2004).** Bisphosphonates: Preclinical Review. *The Oncologist* 9: 3-13.
- Harding AK, Toksvig-Larsen S, Tägil M, et al. (2010).** A single dose zoledronic acid enhances pin fixation in high tibial osteotomy using the hemicallotaxis technique. A double-blind placebo controlled randomized study in 46 patients. *Bone* 46: 649-654.
- Hartmann C (2006).** A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis. *Trends in cell biology* 16: 151-158.
- Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, et al. (2006).** The Roles of Osteoprotegerin and Osteoprotegerin Ligand in the Paracrine Regulation of Bone Resorption. *Journal of Bone and Mineral Research* 15: 2-12.
- Houshmand B, Rahimi H, Ghanavati F, et al. (2007).** Boosting effect of bisphosphonates on osteoconductive materials: a histologic in vivo evaluation. *Journal of Periodontal Research* 42: 119-123.
- Huelsken J y Birchmeier W (2001).** New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Current Opinion in Genetics & Development* 11: 547-553.

- Hughes DE, MacDonald BR, Russell RG, et al. (1989).** Inhibition of osteoclast-like cell formation by bisphosphonates in long-term cultures of human bone marrow. *The Journal of clinical investigation* 83: 1930-1935.
- Ikeda S, Kishida S, Yamamoto H, et al. (1998).** Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3[beta] and [beta]-catenin and promotes GSK-3[beta]-dependent phosphorylation of [beta]-catenin. *EMBO J* 17: 1371-1384.
- Im G-I, Qureshi SA, Kenney J, et al. (2004).** Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. *Biomaterials* 25: 4105-4115.
- Ito M, Chokki M, Ogino Y, et al. (1998).** Comparison of cytotoxic effects of bisphosphonates in vitro and in vivo. *Calcified Tissue International* 63: 143-147.
- Kahler RA, Galindo M, Lian J, et al. (2006).** Lymphocyte enhancer-binding factor 1 (Lef1) inhibits terminal differentiation of osteoblasts. *Journal of Cellular Biochemistry* 97: 969-983.
- Kahler RA, Yingst SMC, Hoepfner LH, et al. (2008).** Collagen 11a1 is indirectly activated by lymphocyte enhancer-binding factor 1 (Lef1) and negatively regulates osteoblast maturation. *Matrix Biology* 27: 330-338.
- Kaiser M, Mieth M, Liebisch P, et al. (2008).** Serum concentrations of DKK-1 correlate with the extent of bone disease in patients with multiple myeloma. *European Journal of Haematology* 80: 490-494.
- Katanaev VL, Ponzielli R, Sémériva M, et al. (2005).** Trimeric G Protein-Dependent Frizzled Signaling in *Drosophila*. *Cell* 120: 111-122.
- Kato M, Patel MS, Levasseur R, et al. (2002).** Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *The Journal of Cell Biology* 157: 303-314.
- Kim H, Kim J, Abbas A, et al. (2009).** Alendronate Enhances Osteogenic Differentiation of Bone Marrow Stromal Cells: A Preliminary Study. *Clinical Orthopaedics and Related Research*® 467: 3121-3128.
- Krishnan V, Bryant HU y MacDougald OA (2006).** Regulation of bone mass by Wnt signaling. *The Journal of clinical investigation* 116: 1202-1209.
- Kyle RA y Rajkumar SV (2008).** Multiple myeloma. *Blood* 111: 2962-2972.
- Li X, Zhang Y, Kang H, et al. (2005).** Sclerostin Binds to LRP5/6 and Antagonizes Canonical Wnt Signaling. *Journal of Biological Chemistry* 280: 19883-19887.
- Lin JH (1996).** Bisphosphonates: A review of their pharmacokinetic properties. *Bone* 18: 75-85.
- Linderbäck P, Areva S, Aspenberg P, et al. (2010).** Sol-gel derived titania coating with immobilized bisphosphonate enhances screw fixation in rat tibia. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 94A: 389-395.

- Ling L, Nurcombe V y Cool SM** (2009). Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells. *Gene* 433: 1-7.
- Liu C, Li Y, Semenov M, et al.** (2002). Control of  $\beta$ -Catenin Phosphorylation/Degradation by a Dual-Kinase Mechanism. *Cell* 108: 837-847.
- Liu T, DeCostanzo AJ, Liu X, et al.** (2001). G Protein Signaling from Activated Rat Frizzled-1 to the beta -Catenin-Lef-Tcf Pathway. *Science* 292: 1718-1722.
- Liu XX, Rubin JS y Kimmel AR** (2005). Rapid, Wnt-induced changes in GSK3 beta associations that regulate beta-catenin stabilization are mediated by G alpha proteins. *Current Biology* 15: 1989-1997.
- Mackie PS, Fisher JL, Zhou H, et al.** (2001). Bisphosphonates regulate cell growth and gene expression in the UMR 106-01 clonal rat osteosarcoma cell line. *Br J Cancer* 84: 951-958.
- Mao B, Wu W, Davidson G, et al.** (2002). Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/[beta]-catenin signalling. *Nature* 417: 664-667.
- Masarachia P, Weinreb M, Balena R, et al.** (1996). Comparison of the distribution of 3H-alendronate and 3H-Etidronate in rat and mouse bones. *Bone* 19: 281-290.
- Miettinen S, Jaatinen J, Pelttari A, et al.** (2009). Effect of locally administered zoledronic acid on injury-induced intramembranous bone regeneration and osseointegration of a titanium implant in rats. *Journal of Orthopaedic Science* 14: 431-436.
- Murakami H, Takahashi N, Sasaki T, et al.** (1995). A possible mechanism of the specific action of bisphosphonates on osteoclasts: Tiludronate preferentially affects polarized osteoclasts having ruffled borders. *Bone* 17: 137-144.
- Nishikawa M, Akatsu T, Katayama Y, et al.** (1996). Bisphosphonates act on osteoblastic cells and inhibit osteoclast formation in mouse marrow cultures. *Bone* 18: 9-14.
- Pan B, Farrugia AN, To LB, et al.** (2004). The Nitrogen-Containing Bisphosphonate, Zoledronic Acid, Influences RANKL Expression in Human Osteoblast-Like Cells by Activating TNF- $\alpha$  Converting Enzyme (TACE). *Journal of Bone and Mineral Research* 19: 147-154.
- Pearse RN, Sordillo EM, Yaccoby S, et al.** (2001). Multiple myeloma disrupts the TRANCE/osteoprotegerin cytokine axis to trigger bone destruction and promote tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 11581-11586.
- Qiang Y-W, Barlogie B, Rudikoff S, et al.** (2008a). Dkk1-induced inhibition of Wnt signaling in osteoblast differentiation is an underlying mechanism of bone loss in multiple myeloma. *Bone* 42: 669-680.
- Qiang Y-W, Chen Y, Stephens O, et al.** (2008b). Myeloma-derived Dickkopf-1 disrupts Wnt-regulated osteoprotegerin and RANKL production by osteoblasts: a potential mechanism underlying osteolytic bone lesions in multiple myeloma. *Blood* 112: 196-207.

- Qiu W, Andersen TE, Bollerslev J, et al. (2007).** Patients With High Bone Mass Phenotype Exhibit Enhanced Osteoblast Differentiation and Inhibition of Adipogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Bone and Mineral Research* 22: 1720-1731.
- Reinholz GG, Getz B, Pederson L, et al. (2000).** Bisphosphonates Directly Regulate Cell Proliferation, Differentiation, and Gene Expression in Human Osteoblasts. *Cancer Research* 60: 6001-6007.
- Roelofs AJ, Thompson K, Gordon S, et al. (2006).** Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 12: 6222s-6230s.
- Roelofs AJ, Thompson K, Ebetino FH, et al. (2010).** Bisphosphonates: molecular mechanisms of action and effects on bone cells, monocytes and macrophages. *Current pharmaceutical design* 16: 2950-2960.
- Rogers MJ (2004).** From Molds and Macrophages to Mevalonate: A Decade of Progress in Understanding the Molecular Mode of Action of Bisphosphonates. *Calcified Tissue International* 75: 451-461.
- Russell R, Watts N, Ebetino F, et al. (2008).** Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporosis International* 19: 733-759.
- Russell RGG (2011).** Bisphosphonates: The first 40years. *Bone* 49: 2-19.
- Saad F (2008).** New research findings on zoledronic acid: Survival, pain, and anti-tumour effects. *Cancer treatment reviews* 34: 183-192.
- Sato M, Grasser W, Endo N, et al. (1991).** Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. *The Journal of clinical investigation* 88: 2095-2105.
- Schoppet M, Preissner KT y Hofbauer LC (2002).** RANK Ligand and Osteoprotegerin: Paracrine Regulators of Bone Metabolism and Vascular Function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 549-553.
- Sezer O, Heider U, Zavrski I, et al. (2003).** RANK ligand and osteoprotegerin in myeloma bone disease. *Blood* 101: 2094-2098.
- Spencer GJ, Utting JC, Etheridge SL, et al. (2006).** Wnt signalling in osteoblasts regulates expression of the receptor activator of NFkappaB ligand and inhibits osteoclastogenesis in vitro. *J Cell Sci* 119: 1283-1296.
- Terpos E y Dimopoulos M-A (2005).** Myeloma bone disease: pathophysiology and management. *Annals of Oncology* 16: 1223-1231.

- Van Wesenbeeck L, Cleiren E, Gram J, et al.** (2003). Six novel missense mutations in the LDL receptor-related protein 5 (LRP5) gene in different conditions with an increased bone density. *American journal of human genetics* 72: 763-771.
- Viereck V, Emons G, Lauck V, et al.** (2002). Bisphosphonates Pamidronate and Zoledronic Acid Stimulate Osteoprotegerin Production by Primary Human Osteoblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 291: 680-686.
- Vitté C, Fleisch H y Guenther HL** (1996). Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated resorption. *Endocrinology* 137: 2324-2333.
- von Knoch F, Jaquier C, Kowalsky M, et al.** (2005). Effects of bisphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 26: 6941-6949.
- Wang J y Stern PH** (2011). Dose-dependent differential effects of risedronate on gene expression in osteoblasts. *Biochemical Pharmacology* 81: 1036-1042.
- Wang S-Y, Liu Y-Y, Ye H, et al.** (2011). Circulating Dickkopf-1 Is Correlated with Bone Erosion and Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *The Journal of Rheumatology* 38: 821-827.
- Wermelin K, Aspenberg P, Linderbäck P, et al.** (2008). Bisphosphonate coating on titanium screws increases mechanical fixation in rat tibia after two weeks. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 86A: 220-227.
- Xin Z, Kim Y y Jung S** (2009). Risedronate inhibits human osteosarcoma cell invasion. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 28: 105.
- Xiong Y, Yang HJ, Feng J, et al.** (2009). Effects of Alendronate on the Proliferation and Osteogenic Differentiation of MG-63 Cells. *The Journal of International Medical Research* 37: 407-416.
- Yeh HS y Berenson JR** (2006). Treatment for Myeloma Bone Disease. *Clinical Cancer Research* 12: 6279s-6284s.
- Zhang FL y Casey PJ** (1996). Protein prenylation: Molecular mechanisms and functional consequences. *Annual Review of Biochemistry* 65: 241-269.