

UCH-FC
Biotecnología
A945
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

**ESTUDIO DEL EFECTO DE WNT5A EN LA DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA
DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMÁTICAS HUMANAS (hMSCs)**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de INGENIERO EN BIOTECNOLOGIA MOLECULAR

MARIA CELESTE AVALOS ARAYA

Director de Seminario de Título: Dr. Juan Pablo Rodríguez

Co Director de Seminario de Título: Dr. Julio Tapia Pineda

Junio, 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. o Srta.:

MARIA CELESTE AVALOS ARAYA

“ESTUDIO DEL EFECTO DE WNT5A EN LA DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMÁTICAS HUMANAS (hMSCs)”

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

Dr. Juan Pablo Rodríguez
Director Seminario de Título

Dr. Julio Tapia
Co-Director

Comisión de Evaluación

Dra. Verónica Palma
Presidente Comisión

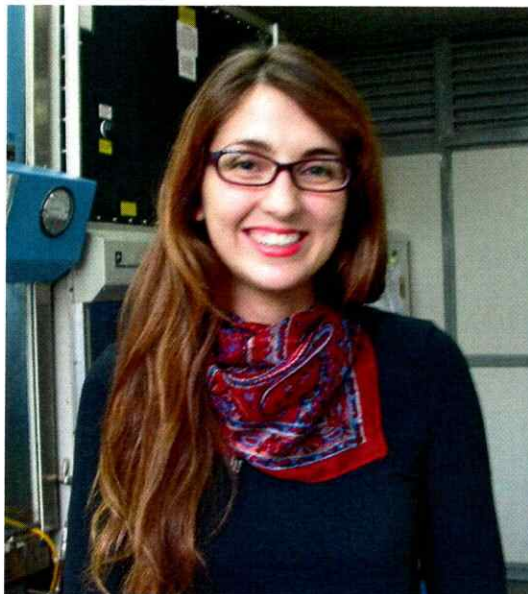
Dr. Alexander Vargas
Corrector

Dra. María Rosa Bono
Patrocinante

Se muestran tres firmas manuscritas en azul sobre líneas horizontales, correspondientes a los miembros de la Comisión de Evaluación y al Director del Seminario de Título. A la derecha de las firmas se encuentra un sello circular de la Facultad de Ciencias, Biblioteca Central, U. de Chile.

Santiago de Chile, Junio 2012

BIOGRAFÍA



María Celeste Avalos Araya nació el 4 de Septiembre de 1986 en Santiago de Chile. Siendo la menor de tres hermanas, siempre le llamó la atención los seres vivos, teniendo un especial cariño por sus mascotas. Por consiguiente quiso ser veterinaria, pero con el paso del tiempo el tema íntimo-fraternal con los animales y el miedo a las agujas no le permitieron estudiar aquello. Sin embargo en el colegio Dunalastair se dio cuenta que lo suyo era la ciencia. Desde primero medio ya sabía que quería estudiar Biotecnología llegando a ser una de las alumnas mas destacadas, ganándose el premio de biología dos años consecutivos. Pero no sólo la ciencia es lo único que le motiva, el deporte y las artes siempre estuvieron presentes, como el Hockey en la época escolar y el Snowboard ya universitaria. De siempre ha sido patiperra y la experiencia de vivir nuevas culturas es algo que al igual que la ciencia le motiva mucho y por nada del mundo teme.

La verdad es que a pesar de que Celeste cree haber escogido bien su destino profesional no es su única razón de vivir, hay muchos intereses que están presentes y eso hace ser una persona simple pero con varias aptitudes e intereses aún pendientes.



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar y por lejos lo más importante es agradecer a mi mamá Marcela y a mi papá Jorge por apoyarme siempre, quererme y aceptar estudiar una carrera que para ellos era totalmente desconocida. También agradecer a mis hermanas Vivi y Pacha, mi abuela Chichi y amigas más cercanas que muchas veces tuvieron que aguantar mi mal genio o ausencia a eventos durante varios fin de semanas de estudio.

Quiero agradecer a mi director de tesis Juan Pablo Rodríguez por darme la oportunidad de trabajar con él. Siempre me entregó toda su confianza y libertad para yo desarrollarme profesionalmente. Además, agradecer a grandes profesores que conocí durante este desafío como el profesor Jorge Martínez y a mi co-director Julio Tapia, especialmente por siempre darme buenos consejos.

No puedo dejar de mencionar a mis muy buenas amigas de universidad ambientales y biotecs con las cuales compartimos largas días y noches estudiando o haciendo trabajos interminables. En especial a mi amigo Agustín que físicamente ya no está en esta tierra pero que fue el primero con quien hablé siendo mechona y con el cual más de una rabia pasé.

No hubiese podido realizar esta tesis sin mencionar a todos mis compañeros y amigos del laboratorio de Biología Celular del INTA. Nico M., M.E., Nicolás T., Nati F, Marce T. y Don José me acompañaron en momentos difíciles y a la vez divertidos. Como olvidar todas las chancherías como los glotones las papas fritas o las cabritas de la feria.

Finalmente decir que estoy muy agradecida con todas las personas que han contribuido a mi desarrollo tanto profesional como emocional. He tenido mucha suerte.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. RESUMEN	1
1. Abstract	2
II. INTRODUCCIÓN	3
1. Metabolismo del Hueso.....	3
2. Multipotencialidad de MSCs.....	3
3. Osteoblastogenesis.....	5
4. Remodelamiento del tejido óseo	6
5. Osteoporosis, un problema de salud en Chile	7
6. Señalización de la vía Wnt canónica en el tejido óseo	10
7. Proteínas JNK y Vía de señalización	14
8. Efectos y Funcionalidad de Wnt5a.....	15
III. HIPÓTESIS	19
IV. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS	19
1. Objetivos Generales.....	19
2. Objetivos Específicos	19
V. MATERIALES Y MÉTODOS	20
1. Sujetos donantes de MSCs.....	20
2. Aislamiento y Cultivo Celular.....	21
3. Diferenciación Osteogénica	22
4. Purificación de RNA, PCR Semicuantitativo y SYBR Green PCR.....	22
5. Lisis Celular y Western Blot	24
6. Ensayos de Proliferación Celular con MTS.....	26
7. Tinción de hMSCs con Rojo De Alizarin	26
8. Análisis Estadístico	27
VI. RESULTADOS	28
1. Efecto de Wnt5a en la proliferación de hMSCs.....	28
2. Activación de phospho JNK a través de Wnt5a en hMSCs	30
3. Efecto de Wnt5a en la expresión de genes osteogénicos en hMSCs	32

4. Evaluar el efecto de Wnt5a en el nivel de la proteína Osx, y de β -catenina en hMSCs.....	34
5. Estudiar el efecto de la inhibición de JNK sobre la mineralización.	36
6. Expresión de Ror2 y Wnt5a en C-hMSCs y O-hMSCs	38
VII. DISCUSIONES	39
VIII. CONCLUSIONES	49
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferenciación de MSCs.....	4
Figura 2. Remodelamiento Óseo.....	6
Figura 3. Deficiencias en estrógeno reducen la masa ósea en osteoporosis,	9
Figura 4. Vías de señalización Wnt canónica y no canónicas.....	12
Figura 5. Fenotipos de ratones knock out para Ror2 y Wnt5a.	16
Figura 6. Efecto en la proliferación de hMSCs.	28
Figura 7. Efecto en la proliferación de SaOs-2.....	29
Figura 8. Efecto de Wnt5a sobre la fosforilación de JNK en hMSCs.	30
Figura 9. Wnt5a no activa a JNK en hMSCs en presencia de SP600125.....	31
Figura 10. Expresión de genes osteogénicos en hMSCs controles.	33
Figura 11. Wnt5a incrementa la expresión de Osx y depende de JNK en hMSCs.	35
Figura 12. Wnt5a no tiene un efecto sobre β-catenina en hMSCs.....	36

Figura 13. Efecto de SP600125 y el anticuerpo contra Wnt5a en el desarrollo de depósitos de calcio en hMSCs.	37
Figura 14. Expresión de Wnt5a y Ror2 en O-hMSCs y C-hMSCs.	38
Figura 15. Wnt5a activa la vía Wnt no canónica dependiente de JNK durante la diferenciación osteogénica de MSCs.	45
Figura 16. Modelo general diferenciación de MSCs a Osteoblastos.	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Partidores utilizados en la amplificación por PCR.	24
Tabla II. Partidores utilizados en la amplificación con SYBR-Green.	24

ABREVIATURAS

ALP	Fosfatasa Alcalina
DMO	Densidad mineral ósea
BMUs	Unidad Multicelular Básica
BMP2	Bone Morphogenetic Protein 2
BSA	Albúmina de suero bovino
BSP-II	Integrin-binding Sialoprotein II
Cbfa1	Core binding factor 1
DEXA	Absorciometría de doble energía radiológica
DMEM	Medium Eagle modificado por Dulbecco
DMEM-SF10%	DMEM suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
ERK	Extracellular Related Kinase
FDZ	Receptores Fridzzeld
GPDH	Glucosa Fosfato Deshidrogenasa
GSK3 β	Glycogen synthase kinase 3 beta
IGF-1	Insulin-like growth factor-I
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
LRP6	Low-density lipoprotein receptor-related protein 6
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
hMSCs	Células Mesenquimáticas Troncales Estromales Humanas
MO	Medio de diferenciación Osteogénico
OPG	Osteoprotegerin
Osteoide	Matriz Extracelular No Calcificada
Osx	Osterix
PAGE	Electroforesis en geles de acrilamida
PBS	Tampón fosfato salino
PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
RANK-L	Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand
RT-PCR	Reverse Transcripte Polymerase Chain Reaction
Runx2	Runt-related transcription factor 2
Ror2	Orphan receptor 2
SDS	Dodecilsulfato de Sodio
SP600125	Anthra[1-9cd]-pyrazol-6(2H)-one, JNK inhibitor

I. RESUMEN

La osteogénesis es un proceso en el cual células mesenquimáticas estromales se diferencian a osteoblastos, que son las células encargadas de la formación del tejido óseo. Este proceso es regulado por varios factores, entre ellos, por la vía de señalización Wnt canónica. Recientemente, evidencias demuestran la importancia de la vía Wnt no canónica dependiente de la proteína JNK activada a través de la proteína Wnt5a. El objetivo de este seminario de título, fue estudiar el efecto de Wnt5a sobre la diferenciación osteogénica de hMSCs obtenidas de mujeres donantes. Las células fueron purificadas y cultivadas utilizando un método previamente establecido, y se analizó su capacidad de proliferación y de diferenciación a osteoblastos a través de la expresión de genes selectos y mediante la formación de depósitos de calcio. Además, se evaluó la capacidad de Wnt5a de inducir la fosforilación de JNK.

Los resultados sugieren que hMSCs expresan Wnt5a y su receptor Ror2, y que este último aumenta su expresión en células cultivadas en medio osteogénico. Wnt5a aumenta la expresión de *osx* y *bsp*, y ambos genes disminuyen su expresión cuando JNK se encuentra inhibida. Por otro lado, se comprobó que Wnt5a es capaz de activar a JNK y que SP600125 inhibe la fosforilación de JNK. La inhibición de la vía no canónica o la neutralización de Wnt5a con el anticuerpo anti Wnt5a disminuyen el depósito de calcio en comparación al control osteogénico.

Wnt5a ni JNK tendrían un efecto sobre los niveles de proteína de β -catenina; sin embargo, los resultados sugieren que la ausencia de Wnt5a aumenta la proliferación celular de hMSCs controles. En conclusión, los resultados sugieren que la vía Wnt no canónica dependiente de JNK favorece la diferenciación de hMSCs a osteoblastos ya que aumenta la expresión de genes osteogénicos como *osx* y *bsp* y la mineralización de la matriz extracelular.

ABSTRACT

Osteogenesis is a process in which mesenchymal stromal cells differentiate into osteoblasts, which are the cells responsible for bone formation. This process is regulated by several factors, including the canonical Wnt signaling pathway. Recent evidence demonstrates the importance of the JNK non-canonical Wnt signaling pathway, activated through the Wnt5a protein.

The aim of this research project was to study the effect of Wnt5a on osteogenic differentiation of hMSCs obtained from female donors undergoing hip surgery. Cells were purified and cultured using a previously established method and analyzed in their ability to proliferate and to differentiate into osteoblasts through the measurement of selected gene expression and calcium deposition. Furthermore, we measured the effect of Wnt5a on JNK phosphorylation.

The results suggest that hMSCs express *wnt5a* and its receptor *ror2*, and the latter increases its expression in cells cultured in osteogenic medium. Furthermore, Wnt5a increases osteogenic gene expression of *osx* and *bsp*, while both genes decrease their expression when JNK is inhibited. Also Wnt5a is capable of effectively activate JNK and SP600125 inhibits phosphorylation of JNK. Inhibition of non-canonical JNK or neutralizing with the antibody for Wnt5a decreases the deposition of calcium compared to cells treated only with osteogenic medium. Wnt5a did not have an effect on the protein levels of β -catenin; however, the results of cell proliferation experiments suggest that blocking Wnt5a increased cell proliferation.

In conclusion, Wnt5a promotes the differentiation of hMSCs into osteoblasts as it increases the expression of osteogenic genes like *osx* and *bsp*, and the mineralization of the extracellular matrix through at least in part, of the Wnt noncanonical signaling pathway dependent on JNK.

II. INTRODUCCION

1. Metabolismo del hueso

El sistema esquelético, órgano vital para el ser humano, está compuesto por la totalidad de los huesos y tiene una composición bastante compleja, lejos de la visión inerte de su estructura como se piensa. Es más, una serie de funciones se encuentran relacionadas a los huesos como: soporte mecánico de órganos y/o tejidos blandos, participación en la acción muscular, protección del sistema nervioso central, reservorio y liberación de calcio u otros iones para la mantención de microambiente del fluido extracelular (Rodan, 1998).

La formación de hueso es un proceso complejo que parte en estadios tempranos del desarrollo embrionario y persiste durante la adultez. Según la literatura ((Shapiro, 2008), la formación de un hueso largo requiere alrededor de 16 etapas, además de una serie de subetapas las cuales varían según el tipo de hueso. Existen principalmente dos procesos de formación ósea: la osificación intramembranosa y la endocondreal (Hartmann, 2006). Algunos huesos del cráneo y de las clavículas se generan a partir de la osificación intramembranosa, mientras que la mayoría de los huesos se forman a través de una osificación endocondreal, a partir de una pre-estructura cartilaginosa.

2. Multipotencialidad de MSCs

El desarrollo y la mantención del hueso es un proceso dinámico entre la formación y la degradación del tejido óseo. Las células encargadas de estos procesos son los osteoblastos y osteoclastos, respectivamente. Los primeros derivan de las células progenitoras mesenquimáticas (MSCs) y los segundos de progenitores hematopoyéticos. Las MSCs en el adulto no presentan antígenos comunes a células hematopoyéticas como CD45, CD34 y CD14 (Pittenger et al.,

1999), y su nicho se encuentra principalmente en el estroma de la médula ósea. Sin embargo, hoy se sabe que es posible obtener este tipo celular a partir de otros tejidos como grasa, pulmón, músculo esquelético, diente y cordón umbilical (Baksh et al., 2004; Orbay et al., 2012; Peters et al., 2010).

Las MSCs presentan dos características esenciales: su potencial de auto renovación y la capacidad de diferenciarse a múltiples linajes. En el primer caso, estas células tienen la capacidad de replicarse y generar copias exactas de la célula original durante un período indeterminado o durante toda la vida del organismo. Por otro lado, la capacidad de diferenciarse a diferentes linajes celulares, como osteoblastos, adipocitos, condrocitos y miocitos, se conoce como multipotencialidad (Pittenger et al., 1999). Esta capacidad de diferenciación depende de factores locales que junto a células y componentes de la matriz extracelular generan un microambiente que favorece el desarrollo de un tipo celular en particular (Figura 1).

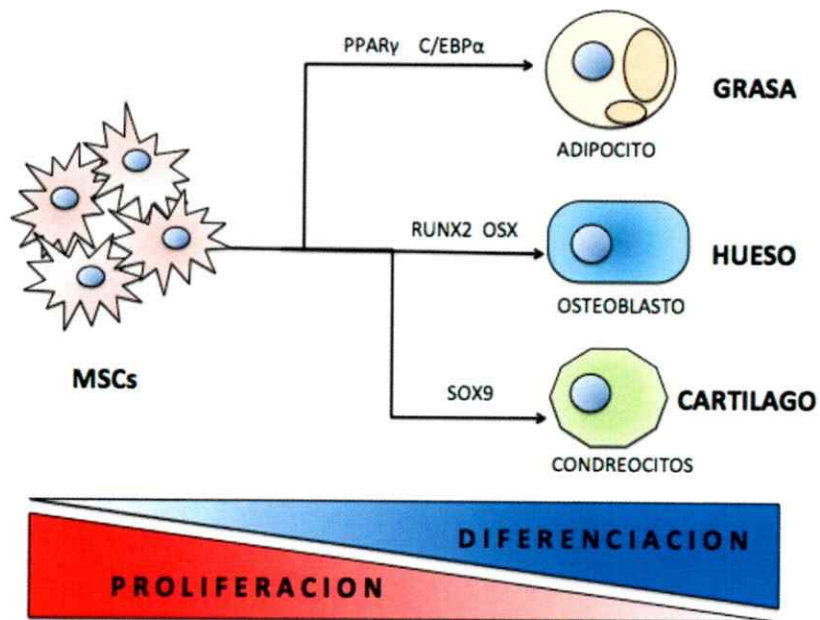


Figura 1. Diferenciación de MSCs.

MSCs en el adulto presentan la capacidad de auto renovarse y diferenciarse a diferentes tipos celulares a través de la expresión de factores de transcripción específicos.

3. Osteoblastogénesis

Durante la osteogénesis, las MSCs se dividen asimétricamente generando precursores de osteoblastos, que progresan para formar osteoprogenitores, preosteoblastos, osteoblastos funcionales capaces de mineralizar el tejido óseo y finalmente osteocitos. Cada etapa es finamente regulada por la activación de factores de transcripción específicos y otros marcadores óseos. Dentro de las principales proteínas que controlan la diferenciación se encuentran Runx2, Osterix, Dlx5 y MSX (Krishnan et al., 2006).

Runx2, también conocido como Cbfa1 (core-binding factor α 1), pertenece a la familia de genes con dominio runt. Existen 3 genes en esta familia, de los cuales *runx2* sería esencial para la generación y maduración de osteoblastos. Los restantes factores de transcripción, Runx1 y Runx3, estarían involucrados en la hematopoyesis y la diferenciación neuronal y gastrointestinal, respectivamente (Lamour et al., 2007). Ratones knock out para *runx2* mueren después de nacer y presentan anomalías en la osificación general y en la maduración de osteoblastos (Komori et al., 1997). Subsecuentemente, el factor de transcripción *Osx* no se expresa en estas mutantes, por lo que actuaría río abajo de Runx2. Sin embargo, la expresión de *osx* es igualmente necesaria para una correcta formación ósea, puesto que ratones knock out para este gen no generan tejido óseo ni por osificación endocondreal ni intramembranosa, puesto que las células no se diferencian y no son capaces de depositar matriz extracelular calcificada (Nakashima et al., 2002). Además, la expresión de marcadores clásicos de diferenciación osteogénica, como fosfatasa alcalina (*alp*), sialoproteína de hueso (*bsp*) y osteopontina (*opn*), son casi indetectables.

No sólo hay que tomar en consideración factores expresados en las mismas células, sino que existe una variedad de otras moléculas locales fundamentales para una correcta diferenciación. Ejemplos de éstas son la proteínas BMP2 (bone

morphogenetic protein 2), Shh (Sonic Hedgehog) e Ihh (Indian Hedgehog), de la familia de las proteínas Hedghog, y hormonas como PTH, la forma activa de vitamina D, glucocorticoides y estrógenos (Yamaguchi et al., 2000).

4. Remodelamiento del tejido óseo

Durante la vida de un organismo vertebrado, el remodelamiento del sistema esquelético es un proceso continuo el cual es esencial para el mantenimiento de la masa ósea y su microarquitectura. La unidad multicelular básica (BMU) (Figura 2), encargada de reemplazar aquellos sectores de hueso dañado o viejo por tejido óseo nuevo, está compuesta por osteocitos mecanosensitivos, osteoblastos formadores de hueso y osteoclastos encargados de la resorción del tejido dañado (Robling et al., 2006).

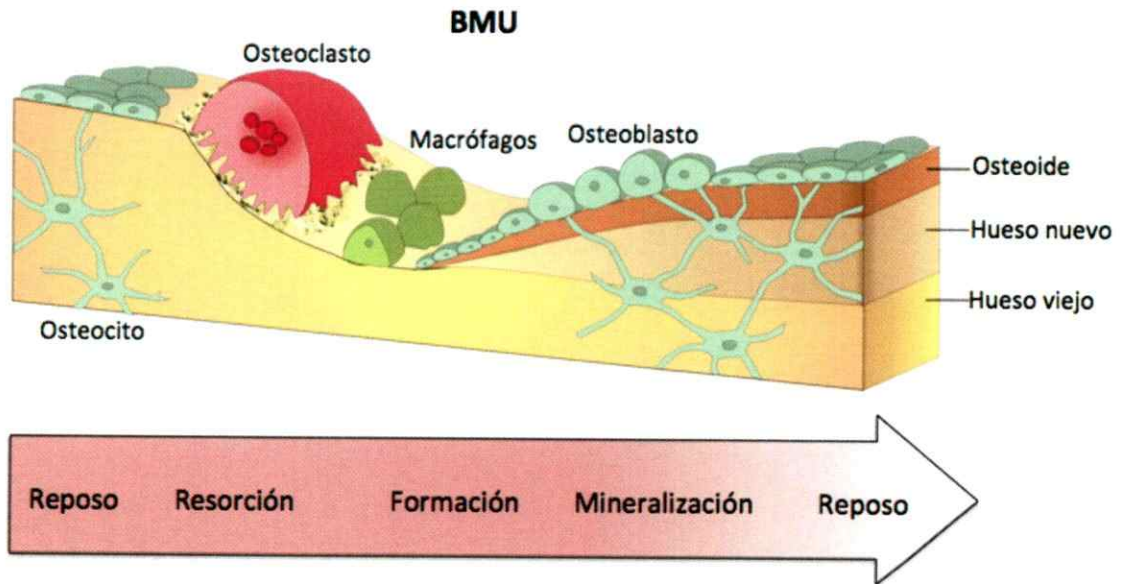


Figura 2. Remodelamiento Óseo.

El Recambio de material óseo ocurre continuamente y está dado por un ciclo en donde osteoclastos activados actúan sobre el lugar dañado o viejo. Luego de la resorción, los osteoblastos secretan material mineralizado. (Adaptado de Osteocord, Bone from blood/ <http://www.york.ac.uk/res/bonefromblood/index.html>)

En el 95% de la superficie del hueso de un adulto no ocurre ni resorción ni formación de hueso debido a un efecto inhibitorio basal por parte de los osteocitos. Sin embargo, cuando ocurre algún microdaño, los osteocitos actúan como mecanosensores y responden secretando citoquinas como OPG y gatillando la expresión del ligando RANK en la superficie de los osteoblastos (Gogakos et al., 2009). Esto genera un reclutamiento y activación de osteoclastos, dando por iniciada la resorción ósea, proceso que puede durar entre 2 a 4 semanas. Básicamente, lo que se genera es una especie de túnel con una perforación de 250–300 μm y la posterior apoptosis de dichas células (Robling et al., 2006). Subsecuentemente, los osteoblastos proliferan, maduran y comienzan a secretar osteoide, reemplazando el lugar dañado por un período de aproximadamente 3 meses. Finalmente, los osteoblastos maduros mineralizan la matriz extracelular generando tejido óseo nuevo donde pueden insertarse osteocitos completamente maduros o ir a apoptosis, completando así el ciclo.

Por lo tanto, aunque las actividades de osteoblastos y osteoclastos son contrarias, es necesaria la regulación conjunta a través de la activación y expresión de diferentes vías de señalización y moléculas en ambos tipos celulares. Sólo de esta forma es posible el mantenimiento de la homeostasis del esqueleto, de lo contrario, pueden ocurrir casos de una resorción aumentada, lo que puede llevar a algún tipo de enfermedad, como es el caso de la osteoporosis.

5. Osteoporosis, un problema de salud en Chile.

La osteoporosis es una enfermedad progresiva que se produce principalmente por un desequilibrio en la homeostasis del hueso. Se caracteriza por una mayor degradación que formación del hueso, afectando su microarquitectura y aumentando la fragilidad ósea (Gass and Dawson-Hughes, 2006). En comparación a un hueso sano, se pierde densidad y calidad ósea, provocando una degradación

silenciosa gradual sin muchos síntomas, culminando en fracturas graves, siendo las más comunes en la muñeca, cadera y columna. Diferentes factores pueden favorecer esta condición, no sólo debido a una predisposición genética, si no que también la edad, raza, un mal hábito alimenticio y sedentarismo.

Como antecedentes no menores, la osteoporosis afecta a una de cada 3 mujeres y a uno de cada 5 hombres sobre los 50 años (www.fundop.org). En Estados Unidos, se estima que hoy existen alrededor de 10 millones de individuos con la enfermedad y de ellos 8 millones son mujeres y sólo 2 millones son hombres. En el 2005 alrededor de 2 millones de fracturas y 19 billones de dólares en costos fueron causados por esta enfermedad (National Osteoporosis Foundation, www.nof.org). En nuestro país, alrededor de un 50% de las mujeres sobre 50 años presenta osteopenia (masa ósea menor que la ideal) y alrededor de un 10% tiene osteoporosis establecida. En diferentes grados, ambas condiciones conllevan a un riesgo elevado de fractura (Fundación Chilena de Osteoporosis, <http://www.fundop.org>).

La prevalencia es más común en mujeres postmenopáusicas debido principalmente a una falta de estrógeno. El estrógeno actúa mediante la unión a uno de sus receptores y favorece una mayor formación de tejido óseo sobre la resorción (Figura 3). Específicamente, estudios han demostrado que el estrógeno es capaz de acelerar la apoptosis de osteoclastos mediante un incremento de TGF β (Hughes et al., 1996). Es por esto que hoy en día terapias de reemplazo hormonal con estrógenos son usadas comúnmente como prevención de la enfermedad. Sin embargo, actualmente se conocen otros factores que podrían influir en la predisposición. El calcio almacenado en los huesos actúa como reservorio del mineral y le da el fortalecimiento y rigidez al hueso. A medida que el calcio en el suero disminuye la resorción del hueso aumenta, lo que debilita el tejido óseo. Por esta razón se necesita una absorción eficaz del ión en el intestino. La

vitamina D, en su forma activa ($1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3) es capaz de favorecer la absorción y disminuir la excreción de calcio, por lo que deficiencias en ésta y en factores asociados, como la hormona paratiroidea, pueden también contribuir a una pérdida de masa ósea acelerada (Raisz, 2005).

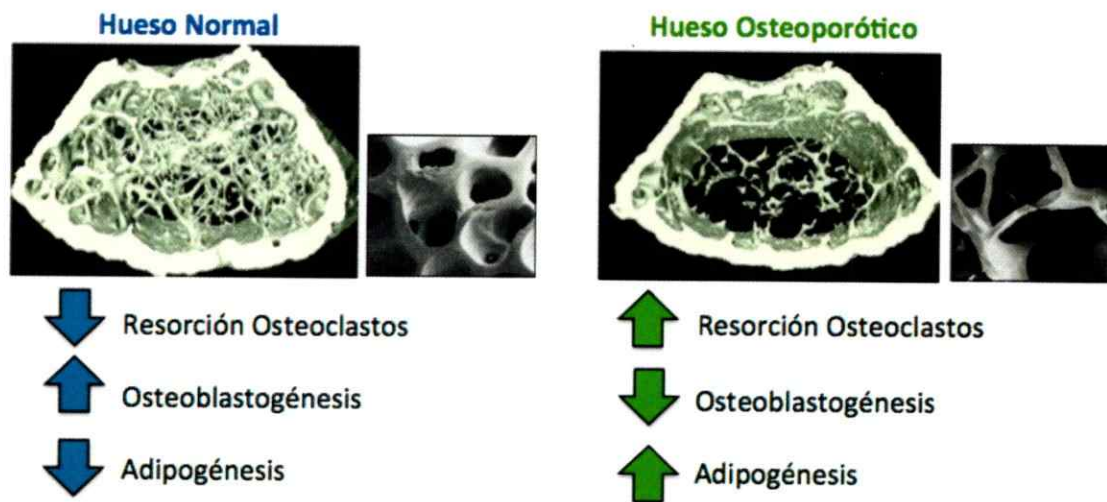


Figura 3. Deficiencias en estrógeno reducen la masa ósea en osteoporosis, La resorción no es compensada suficientemente por la formación de osteoblastos maduros en comparación a un hueso sano. Además, la diferenciación de MSCs a adipocitos se ve favorecida por sobre la de osteoblastos. (Adaptado de Takada et al 2009).

A pesar de que no existe un tratamiento totalmente efectivo contra la osteoporosis, en la actualidad se utilizan diferentes tipos de drogas, ya sea para prevenir o retardar el progreso de la enfermedad. Algunas de las más usadas son inhibidores de la resorción del hueso como los bifosfonatos (alendronato, ibanodronato), drogas anticatabólicas, y agentes anabólicos como la hormona paratiroidea (PTH) (Roux, 2010). Debido a que la mayoría actúa a nivel de inhibición de la resorción del hueso, además de que ninguna es capaz de curar en un 100% la enfermedad, la búsqueda de nuevos tratamientos es de gran interés científico, junto a una mayor comprensión de los diferentes procesos y moléculas involucradas con el inicio y el progreso de la enfermedad.

Por otro lado, evidencia en la literatura y datos de nuestro laboratorio indican que la médula ósea de pacientes con osteoporosis tiene un mayor contenido de tejido adiposo respecto de mujeres normales, lo cual hace suponer que las MSCs pudieran tener un mayor potencial de diferenciación hacia adipocitos que hacia osteoblastos en comparación con individuos sanos o jóvenes (Rodríguez et al., 2009 y Takada et al., 2009). Esta vía de diferenciación preferencial hacia el linaje adipogénico puede explicarse en parte por una mayor expresión y activación del factor de transcripción PPAR γ 2, el cual juega un rol central en la diferenciación a adipocitos y, a su vez, regula negativamente la diferenciación hacia el linaje osteogénico.

El compromiso y la diferenciación hacia osteoblastos o adipocitos requieren de la expresión y la acción de varios factores reguladores sobre las MSCs. En la osteogénesis, como se mencionó, se requiere la expresión de factores de transcripción como Runx2/Cbfa1, Osterix, y la supresión de factores adipogénicos como PPAR γ 2. Esta regulación está relacionada en parte con dos vías independientes: la vía Wnt canónica, con β -catenina como proteína reguladora central, y la vía Wnt no canónica. Ambas actúan promoviendo la osteogénesis y reprimiendo la adipogénesis, pero en distintas etapas, por lo que la correcta activación de cada vía es esencial en el desarrollo de cada tipo celular.

6. Señalización de las vías Wnt en el tejido óseo.

Las proteínas Wnt son una familia de 19 glicoproteínas altamente conservadas en mamíferos (Angers and Moon, 2009). Están involucradas en diferentes procesos, algunos de los cuales incluyen el desarrollo embrionario, crecimiento celular, migración, homeostasis y generación de la polaridad celular planar en *Drosophila* y *Xenopus* (Mikels et al., 2009; Ling et al., 2009). Se clasifican

en diferentes subfamilias dependiendo de la vía de señalización que activan. La subfamilia de Wnt1 (formada por Wnt1, 2, 3, 3a, y 8) activa la vía de señalización Wnt canónica dependiente de β -catenina; mientras que la familia de Wnt5a (como Wnt5a, 4, 6, 7a y 11) activa las vías no canónicas dependiente de calcio (Kohn and Moon, 2005) y JNK dependiente (Liu et al., 2008; Ling et al., 2009). De los antecedentes aportados por varios reportes, se puede concluir que ambas vías estarían involucradas en la diferenciación celular y destino de las MSCs (Hartmann, 2006; Krishnan et al., 2006).

La vía Wnt canónica opera mediante la unión del ligando Wnt a uno de los 10 receptores de membrana de la familia Frizzled (FZD), el cual a su vez forma un complejo con el co-receptor LRP5/6 (Figura 4). En ausencia de ligando, la quinasa GSK-3 β junto a otras proteínas en el citoplasma se encargan de fosforilar a β -catenina, lo que conlleva su ubiquitinación y la posterior degradación por parte del proteosoma. Sin embargo, esto no ocurre cuando la vía está activa, por lo que los niveles de β -catenina aumentan en el citoplasma, se transloca al núcleo y actúa como un coactivador en complejo con los factores de transcripción Tcf/Lef1, que finalmente favorecen la expresión de genes específicos como *c-myc* y *ciclinaD1* (Angers and Moon, 2009).

Varias proteínas Wnt canónicas han sido relacionadas con la fisiología del hueso. Por ejemplo, ratones knock out para *wnt10b* presentan menores niveles de osteocalcina en el suero y un tejido óseo trabecular disminuido (Bennett et al., 2005). Por el contrario, la sobreexpresión de Wnt10b favorece la expresión de factores de transcripción claves para la osteogénesis, como *osx* y *runx2*. En otro caso, estudios de Boland y colaboradores, (2004) revelan que la sobreexposición de la proteína Wnt3a favorece la proliferación en estadios tempranos de osteogénesis, lo que podría favorecer el número de osteoprecursores. Sin

embargo, en MSCs cultivadas en medio osteoinductivo con Wnt3a, la osteogénesis se ve inhibida debido a una disminución en la activación de TCF por parte de β -catenina. Es decir, el efecto que tienen estas proteínas es variado y depende del contexto celular y de los receptores involucrados.

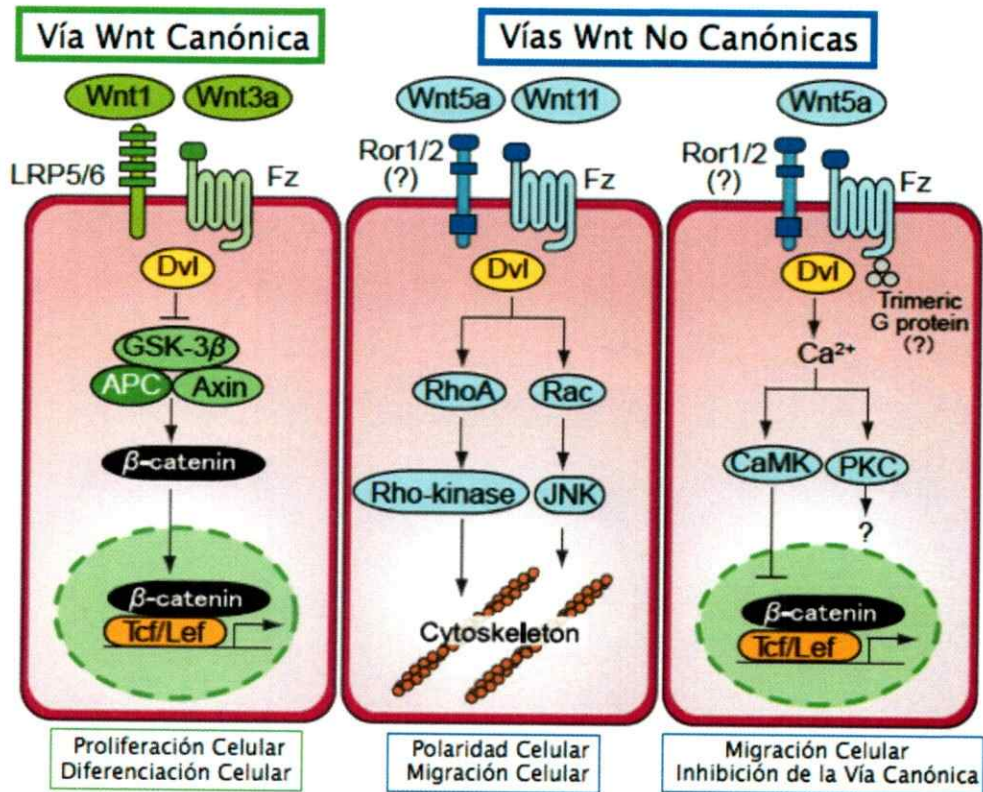


Figura 4. Vías de señalización Wnt canónica y no canónicas.

Dependiendo del tipo de proteína Wnt, esta puede activar al menos 3 vías diferentes. La vía Wnt β -catenina dependiente, y las dos vías no canónicas inicialmente conocidas como Polaridad Celular Planar (PCP) y la vía dependiente de Ca²⁺/PKC-CAMKII. Adaptado de (Kikuchi et al., 2012).

La activación de las vías de señalización Wnt no canónicas presenta una mayor diversidad en cuanto a los estímulos y las moléculas involucradas. En general, todas actúan de forma β -catenina independiente y, de acuerdo al contexto celular, se puede clasificar según la cascada de señalización que activan. Entre las más estudiadas se encuentran la vía de Polaridad Celular Planar (PCP) y la

dependiente del flujo intracelular de calcio. Ambas han sido ampliamente estudiadas en invertebrados, como en *Drosophila* y en pez cebra, específicamente relacionados a procesos como extensión convergente y movimiento celular durante la gastrulación. La activación de cada vía depende principalmente de la combinación de receptores FZD y otros receptores alternativos, como el receptor Ror2.

En el caso particular de la activación de la vía de señalización dependiente del receptor Ror2, éste pertenece a la familia de receptores de membrana con actividad tirosina quinasa (Liu et al. 2007). Estos receptores se han asociado a diferentes procesos, incluyendo proliferación, migración, angiogénesis y sobrevivencia. Más aún, receptores disfuncionales se han relacionado con anomalías esqueléticas, como el Síndrome de Robinow (Afzal and Jeffery, 2003) e incluso con leucemia (Green et al., 2008).

La estructura del receptor presenta en la región extracelular un dominio tipo inmunoglobulina y un dominio rico en cisteínas (CRD; Cystein Rich Domain), este último similar al sitio de unión de proteínas Wnt en los receptores FZD, lo que sugiere que los receptores Ror2 también son capaces de unir este tipo de ligando. Por otro lado, en el dominio intracelular se localiza el dominio con actividad tirosina quinasa (TK). Todos estos dominios serían esenciales para que proteínas como Wnt5a activen vías de señalización a través de este receptor (MacDonald et al., 2009; Mikels et al., 2009).

La activación de la vía de señalización dependiente de JNK puede inducir a proteínas G, como Rho y Rac, las que finalmente inducen la fosforilación de JNK generando cambios en el citoesqueleto. En otros casos, la activación produce la liberación de Ca^{+2} al espacio intracelular, activando proteínas como CAMKII y PKC (Figura 4).

7. Proteínas JNK y vía de señalización.

Las proteínas c-Jun N-Terminal quinasas (JNKs) pertenecen a un gran grupo de proteínas serina/treonina quinasas conocidas como MAPKs, junto a p38 y ERK (Jaiswal et al., 1999; Bogoyevitch and Kobe, 2006). Originalmente, se identificaron por su habilidad de fosforilar al factor de transcripción c-Jun y mediar la muerte celular inducida por estrés, participar en el proceso de la polaridad celular planar en *Drosophila* y estar implicada en procesos de gastrulación y movimientos de extensión convergente embrionarios en *Xenopus* (Liao et al., 2006).

Varios estímulos pueden activar a JNK incluyendo citoquinas, especies reactivas de oxígeno y luz ultravioleta. La mayoría inducen la actividad de alguna MAPK la cual inicia la cascada de señalización; específicamente, JNK puede ser activada por dos quinasas, MKK4 y MKK7. Además, es necesaria la presencia de la proteína de andamio JIP (JNK interacting protein), la cual une el complejo de fosforilación formado por MLK3 (mixed lineage protein kinase), MKK7 y JNK (Zoumpourlis and Vlahopoulos, 2004). Finalmente, JNK es fosforilado en los motivos ThrxTyr y, a su vez, es capaz de fosforilar un amplio rango de sustratos, activando e inhibiendo factores de transcripción como c-Jun y PPAR γ , respectivamente (Bogoyevitch and Kobe, 2006).

La proteína c-Jun pertenece a la familia de factores de transcripción AP-1 (activator protein) que consiste en un amplio grupo de proteínas con dominio BZIP (basic región leucine zipper) al que pertenecen las subfamilias Jun, c-Fos y ATF2. Se les denomina así porque las moléculas dimerizan mediante la formación de un espiral, conocido como "Cierre de Leucina", el cual es precedido por un dominio responsable de la unión específica al DNA. Por otro lado, en el dominio N terminal, JNK es capaz de fosforilar los residuos de serina 62 y 73 y aumentar así la actividad transcripcional de promotores con secuencias específicas para el

complejo AP1 (Zoumpourlis and Vlahopoulos, 2004). La activación de c-Jun se ha visto relacionada con diversos fenómenos celulares como proliferación, migración, apoptosis y diferenciación. Sin embargo, el efecto de la activación de JNK y c-jun depende principalmente del tipo y el contexto celular (Leppa and Bohmann, 1999).

8. Efectos y funcionalidad de Wnt5a

La proteína Wnt5a ha sido extensamente estudiada debido a que se conserva en un amplio rango de especies, desde *Caenorhabditis elegans* a humanos. Además, se le ha asociado a varias funciones celulares como proliferación, diferenciación, migración, adhesión y polaridad. Recientemente, la interacción y la formación de un complejo ternario entre el receptor Ror2, algún receptor Frizzled (al menos con Fz5, Fz6 o FZz7) y la proteína Wnt5a, han recibido gran atención debido a su relación con la diferenciación de MSCs.

Existen varios antecedentes sobre la relación entre Wnt5a y las vías no canónicas (De, 2011; Mikels and Nusse, 2006). Mutantes para *wnt5a* en pez cebra exhiben una reducción en la frecuencia transitoria de Ca^{+2} y defectos en movimientos de extensión convergente (movimiento polarizado morfogénico durante la embriogénesis) (Kikuchi et al., 2012). En *Xenopus*, Wnt5a se une a Ror2 y este activa a JNK quien finalmente aumenta la expresión de una protocaderina esencial para el desarrollo embrionario (Schambony and Wedlich, 2007).

Por otro lado, el patrón de expresión de Wnt5a como de Ror2 en el desarrollo morfológico de ratón es extremadamente similar, detectándose principalmente en la cara, extremidades, cola, pulmones y genitales (Li et al., 2002; Yamaguchi et al., 1999). Mas aún, según el trabajo realizado por Oishi y col. (2003) ratones knock out para *ror2* y *wnt5a* exhiben, a diferencia de ratones controles (WT), fenotipos morfológicos similares pero aún mas severos en aquellos ratones que no expresan el ligando. Principalmente se caracterizan por exhibir enanismo, extremidades

acortadas, anomalías faciales y defectos en el desarrollo del pulmón (Figura 5). Además, ratones que no expresan *Wnt5a* prácticamente no desarrollan paladar debido a un bloqueo en la migración y proliferación de MSCs (He et al., 2008).

Estudios más recientes afirman la relevancia de *wnt5a* y *ror2* también en el desarrollo de los dientes. Dientes provenientes de ratones mutantes para *wnt5a* presentan un menor tamaño, defectos en el patrón y una diferenciación odontoblástica tardía en comparación a ratones wild type. Consistentemente un fenotipo similar se observó en ratones knock out para *ror2* (Lin et al., 2011). Todos estos antecedentes demuestran el rol fundamental tanto del receptor como del ligando para el desarrollo morfológico de diferentes estructuras en el ratón.

Se ha constatado que *Wnt5a* es capaz de activar en diferentes tipos celulares la vía de señalización Wnt no canónica dependiente de JNK, a través de la unión al receptor *Ror2* (Yamanaka et al., 2002; Oishi et al., 2003). Por ejemplo, experimentos realizados en la línea celular NIH3T3 demuestran que *Wnt5a* activa particularmente a JNK y no a P38 y Erk (Yamanaka et al., 2002).

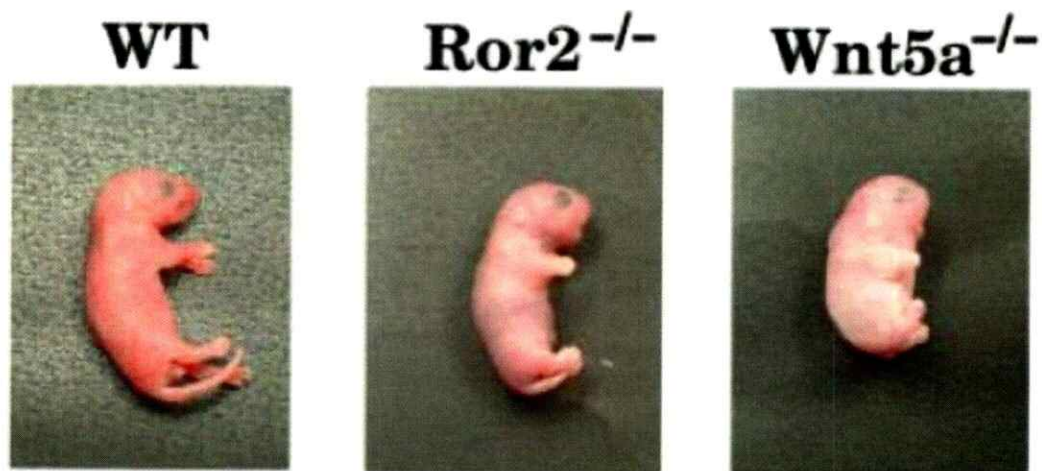


Figura 5. Fenotipos de Ratones knock out para *Ror2* y *Wnt5a*.

En comparación al control (WT), ratones *Ror2^{-/-}* y *Wnt5a^{-/-}* presentan enanismo, anomalías severas faciales, extremidades y colas atrofiadas y atrofia pulmonar. (Oishi et al., 2003)

El efecto tanto autocrino como paracrino de Wnt5a en la diferenciación de hMSC a osteoblastos ha sido poco estudiado. De trabajos publicados recientemente por el grupo de Bilkovski y colaboradores (2010), se ha observado que existe una relación positiva entre el efecto de la proteína Wnt5a y la diferenciación de hMSC a osteoblastos maduros. Este efecto, en parte, sería a través de JNK fosforilada, que posteriormente es capaz de activar al factor de transcripción c-jun, el cual favorecería la expresión de genes específicos como *osteopontina* y *fosfatasa alcalina*. Por otro lado, la infección de hMSC con adenovirus para Ror2 aumenta la expresión del gen *osterix* y favorece no sólo la mineralización de las células en cultivo sino también aumentaría la masa ósea total en hueso de ratón *ex vivo* (Liu et al., 2007). Además, estudios en cultivos primarios de hMSCs, demuestran que la expresión de Ror2 aumenta bajo la estimulación osteogénica. Mas aún, al inhibir Ror2 con un siRNA la activación de JNK se ve bloqueada, no así la activación de p38 o ERK (Liu et al., 2009).

Existen diferentes evidencias que indican que la unión de Wnt5a a receptores específicos en combinación a Ror2 inhibiría, de algún modo, la vía dependiente de β -catenina. Según el trabajo realizado por (Ishitani et al., 2003), Wnt5a activaría la vía Wnt no canónica dependiente de los niveles de calcio intracelular, a través de TAK1-NLK MAPK. La proteína NLK activada fosforilaría a TCF, previniendo que el complejo β -catenina -TCF se una al DNA, por lo que no habría expresión de genes blanco de β -catenina.

Por otro lado, estudios realizados en células HEK293 (Topol et al., 2003) muestran que Wnt5a promueve la degradación de β -catenina independiente de GSK3 β y la vía no canónica activada por CAMKII, lo que dependería de la expresión de Siah2 que forma parte de un complejo alternativo de la ubiquitina ligasa E3 junto a otras proteínas como APC. Este mecanismo podría funcionar

como un mecanismo alternativo de regulación negativa de la vía cuando los niveles en la activación de β -catenina se encuentren indebidamente elevados.

Interesantemente, estudios *in vivo* realizados en embriones de ratón que no expresan Ror2 y positivos a LacZ (Axin^{LacZ/+}mRor2^{-/-}), presentan una señalización a través de β -catenina aumentada. Células que no expresan Ror2 presentan una mayor actividad β -galactosidasa que células de embriones controles (Axin^{LacZ/+}mRor2^{+/-}). Además, este aumento en la expresión de LacZ es específico a las regiones en donde se pierde la expresión de Ror2 (Mikels et al., 2009).

De lo expuesto anteriormente, la expresión de Wnt5a y Ror2 serían esenciales para el desarrollo de la osteogénesis y, por lo tanto, del aumento de la masa ósea. En este seminario de título se propone estudiar el efecto de Wnt5a y conocer el efecto en la inhibición de la vía de señalización dependiente de JNK en el desarrollo de la osteogénesis de células mesenquimáticas humanas.

III. HIPÓTESIS

Wnt5a favorece la diferenciación osteogénica de hMSCs en etapas tempranas y tardías del proceso a través de la activación de la vía Wnt no Canónica dependiente de JNK.

IV. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

1. Objetivo General:

Estudiar el efecto de la proteína Wnt5a en la diferenciación osteogénica y determinar si éste es mediado por la vía de señalización dependiente de JNK en células mesenquimáticas humanas.

2. Objetivos Específicos:

1. Determinar si Wnt5a tiene efecto sobre la proliferación celular de las hMSCs.
2. Evaluar, la activación de la vía de señalización Wnt no canónica por Wnt5a, midiendo los niveles de p-JNK y JNK total en hMSCs.
3. Estudiar el efecto de la presencia y ausencia de Wnt5a en la expresión de genes relacionados con diferenciación osteogénica (*Osx*, *Runx2*, *ALP*, *BSP* y *OPN*) y del receptor Ror2.
4. Evaluar el efecto de Wnt5a en el nivel de la proteína Osterix, y de β -catenina en hMSCs.
5. Estudiar el efecto de la inhibición de la vía de señalización Wnt no canónica dependiente de JNK sobre la diferenciación osteogénica.
6. Medir la expresión de Wnt5a y Ror2 en hMSCs de mujeres controles y osteoporóticas.

V. MATERIALES Y METODOS

1. Sujetos donantes de MSCs.

Células mesenquimáticas humanas (hMSCs) se obtuvieron de mujeres postmenopáusicas voluntarias entre 60 y 75 años de edad, sometidas a cirugía debido a fractura de cadera o algún miembro inferior en el Servicio de Ortopedia y Traumatología del Hospital Sótero del Río, Santiago de Chile. Cada donante, previo a la intervención, firmó un consentimiento informado por escrito autorizando la obtención de un aspirado de médula ósea durante el procedimiento quirúrgico. Este procedimiento se encuentra debidamente aprobado y autorizado por los comités de ética del Hospital Sótero del Río y del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), Universidad de Chile.

Dentro de las 4 semanas post operación, a las pacientes se les determinó la densidad mineral ósea (DMO) mediante el método de absorciometría de doble energía radiológica (DEXA) utilizando un densitómetro Lunar DPX-L (LUNAR, Prodigy, General Electric Medical Systems, Madison, WI, USA). Las pacientes donantes fueron clasificadas como controles u osteoporóticas de acuerdo al valor de t score observado en las vertebrae lumbares L2-L4. Las donantes se seleccionaron como controles si presentaban un t score menor a -2,5 S.D. (es decir, presenta una DMO dentro de un rango del t score promedio de jóvenes sanos \pm 2,5 desviaciones estándar); bajo este valor, las pacientes se consideran osteoporóticas (O-MSCs).

Tanto las pacientes controles y osteoporóticas se consideran sanas en la medida de que no presentan ninguna enfermedad relacionada a osteoporosis, excepto por la fractura ósea. En ningún caso las donantes se encontraban bajo tratamiento con glucocorticoides o terapia de reemplazo hormonal con estrógeno.

2. Aislamiento y Cultivo Celular

Muestras de médula ósea (15 ml) fueron extraídas por aspirado desde la cresta iliaca de pacientes sometidos a cirugía. Las MSCs fueron aisladas y cultivadas basado en el protocolo descrito por (Jaiswal y col (1997)). A 20 ml de Dulbecco's Modified Eagles Medium, DMEM (Sigma, St. Louis, MO, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA) (DMEM-SF10%), se le agregó 15 a 20 ml de aspirado celular fresco, y se centrifugó a 1800 rpm por 5 min para obtener el total celular y descartar la capa de grasa proveniente de la muestra. El pellet celular se resuspendió en 10 ml de DMEM-SF10% suplementado con 80 µg/ml de gentamicina. Se fraccionó en un gradiente de densidad generado al centrifugar en una solución de Percoll al 70% (Sigma) a 13000 x g por 20 min. La muestra se separó en 3 fracciones y se colectó la de menor densidad donde se encuentra la mayor parte de las hMSCs. La fracción recolectada se lavó con DMEM-SF10% y se sembró a una densidad de $2-3 \times 10^7$ células/placa de 60 mm en medio de cultivo DMEM-SF10% a 37°C y en una atmósfera húmeda al 95% de aire y 5% de CO₂. A este primer plaqueo se le denomina cultivo primario de hMSCs y se mantuvieron en estas condiciones cambiando el medio cada 3 días hasta alcanzar la confluencia. Una vez ocurrido esto, las células se lavaron 2 veces con PBS (NaCl 0,14 M; KCl 2,6 mM; NaHPO₄ 7H₂O 0,01M; KH₂PO₄ 1,7 mM ajustado a pH 7,2) y se liberan de la placa agregando tripsina (0,25%) (Hyclone, Thermo Scientific) suplementada con 0,25% EDTA (Sigma) a 37°C por 5 min. Las células fueron centrifugadas a 1800 rpm por 5 min y se resuspendieron y sembraron en placas de 100 mm a una densidad de $3,5 \times 10^5$ células/cm². A esto se le denomina primer subcultivo y se procedió de la misma forma hasta el tercer pasaje.

La línea celular SaOs-2 fue cultivada, a 37°C y 5% de CO₂ en placas de 100 mm hasta confluencia en medio basal, DMEM (Dulbecco's Modified Medium,

GIBCO) más suero fetal al 10% y penicilina/streptomina 1000 ug/ml (HyClone), pH 7,0. Previo a cada experimento las células se liberaron con tripsina 0,25% (Hyclone, Thermo Scientific) como fue descrito anteriormente.

3. Diferenciación osteogénica

Las células se diferenciaron por 2, 4, 8 y 14 días, según cada experimento con medio osteogénico (MO) compuesto por medio DMEM-SF10% suplementado con 100 nM de dexametasona (Sigma, St. Louis, U.S.A), 100 mM de beta-glicerofosfato (Sigma, St. Louis, U.S.A) y 10 μ M de L-ácido ascórbico (Sigma, St. Louis, U.S.A). Se evaluó el efecto y el bloqueo de Wnt5a en la diferenciación, agregando al MO 500 ng/ml de Wnt5a recombinante (645-WN/CF, R&D Systems, Minneapolis, U.S.A) y 2 μ g/ml del anticuerpo anti Wnt5a (sc-23698 Santa Cruz Biotechnology, INC., St. Cruz, U.S.A), respectivamente. Por otro lado, se agregó 20 μ M del inhibidor específico de JNK, SP600125 (Sigma, St. Louis, U.S.A), para estudiar el efecto en la inhibición de la vía Wnt no canónica en la diferenciación osteogénica de las MSCs.

4. Purificación De RNA, PCR Semicuantitativo y SYBR Green PCR

Placas de 60 mm fueron sembradas a una densidad de 2×10^5 células/placa. Una vez que alcanzaron la confluencia se diferenciaron con MO como se describió anteriormente por 4 y 8 días. A los tiempos indicados, las placas fueron lavadas dos veces con PBS y se le agregó 1 ml del reactivo Trizol (Ambion). El RNA total se obtuvo de acuerdo al protocolo del fabricante y fue cuantificado espectrofotométricamente. El DNA complementario (cDNA) se obtuvo de acuerdo al siguiente protocolo: 1 μ g de RNA se sometió a una reacción de transcriptasa reversa con M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, Madison, U.S.A) según el siguiente programa de PCR; 5 min a 70°C, 1 hora y 30 min a 42°C y 15 min a 70°C.

El cDNA obtenido de la reacción se cuantificó espectrofotométricamente. Para las reacciones de PCR se utilizó 200 ng/μl de cDNA, en un volumen total de 28 μl. Como control interno se utilizó partidores para 18S. Los partidores utilizados están listados en la tabla 1.

Se midió la expresión de Ror2 y Wnt5a con SYBR Green qPCR en hMSCs controles y osteoporóticas mediante el método de la curva estándar. Para ello se utilizó cDNA de la línea celular SaOs-2 y se realizaron las curvas con al menos 5 puntos (diluciones 1:5). La concentración relativa de cada muestra se interpoló con la ecuación de la recta. GAPDH se utilizó como control interno y ambos partidores en cuestión fueron generados a partir del programa Beacon Designes 7,9 (www.premierbiosoft.com). Todas las amplificaciones y análisis fueron realizados con el equipo LightCycler de Roche y el software versión 3.5.3, respectivamente. Los ajustes de la línea de base y el umbral (threshold) fueron determinados automáticamente por el programa y los datos fueron analizados por el método de la máxima segunda derivada. La reacción en cada capilar consistió de 1 μl de cDNA, 1 μl de cada partidor (10 μM) 1,2 μl de MgCl₂ (3 mM) y 1μl the LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green 1 mix (Roche) en un volumen total de 10 μl. El protocolo general es el siguiente: Denaturación inicial por 10 min a 95°C, amplificación dividida en 3 etapas; denaturación 5s a 95°C, alineamiento ("annealing") a 62° C y 66° C para Ror2 y Wnt5a, respectivamente, y finalmente elongación a 72°C por 10 s. Se detectó la fluorescencia durante cada etapa de extensión. Después de 40 ciclos se generó una curva de denaturación calentando la muestra a 95°C y luego enfriando a 65°C por 15 s seguido de un aumento lineal de la temperatura hasta 95°C, monitoreando continuamente la señal de fluorescencia. Finalmente las muestras fueron enfriadas a 40°C por 30 s.

Tabla 1. Partidores utilizados en la amplificación por PCR.

Gen	Secuencias Partidores	Ciclos	Tm °C	Producto pb	Gen Bank acc. No
Osterix	5'-AACCCCCAGCTGCCACCTACC-3' 5'-GACGCTCCAGTCATCCGAACG-3'	36	64	457	NM_001173467.1
Runx2	5'-TTGTGGGCCGGAGTGGACGA-3' 5'-AGGGAGGGCCGTGGGTCTG-3'	36	62	250	NM_001024630.3
ALP	5'-ATCCTGTATGGCAATGGGC-3' 5'-GGCGGCAGACTTTGGTTTC-3'	35	58	484	NM_000478.4
BSP	5'-ACAACACTGGGCTATGGAGAGGAC-3' 5'-ACTTGTGGTGGGGTTGTAGGTTCA-3'	39	62	401	NM_004967.3
OPN	5'-CATCTCAGAAGCAGAATCTCCTA-3' 5'-GGAAAGTTCTGACTATCAATCA-3'	39	63	659	NM_001040058.1
Ror2	5'-TCCTTCTGCCACTTCGTGTTCC-3' 5'-TGCTTGCCGTTCTCTGTAATCC-3'	39	62	435	NM_004560.3
Wnt5a	5'-ACACCTCTTCCAAACAGGCC-3' 5'-GGATTGTTAACTCAACTCTC-3'	36	60	567	NM_003392.4
Wnt3a	5'-GGCATCTGTGGCTGCAGCAGCCG-3' 5'-CGGTGCTTCTCCACCACCATCTCCG-3'	36	70	338	NM_033131.3
18S	5'-GGACACGGACAGGATTGACA-3' 5'-GGACATCTAAGGGCATCACAG-3'	26	57	240	AF375055.1

Tabla 2. Partidores utilizados en la amplificación con SYBR-Green.

Gen	Secuencias Partidores	Tm °C	Producto (pb)	Gen Bank acc. No
Ror2	5'-ATCCGAACGACCCTTTAG-3' 5'-TGATATTGTTTACTGGCTCCA-3'	62	99	NM_004560.3
Wnt5a	5'-CCCATTACAGGTTCTCAGCC-3' 5'-CAGCATCACATCACAACACGGA-3'	66	154	NM_003392.4
GAPDH	5'-CAAAATCAAGTGGGGCGATGCTG-3' 5'-TGTGGTCATGAGTCCTTCCACGAT-3'	69	283	NM_002046.3

5. Lisis Celular y Western Blot

Una vez transcurrido el tiempo de cada experimento, las células en placas de 35 mm fueron lavadas en hielo dos veces con PBS y luego lisadas con 90 µl de Buffer EGFR (Hepes 1N pH 7,4 NaCl 15 mM MgCl₂ 2mM EGTA 1mM 1% Tritón100x 10%Glicerol) suplementado con inhibidores de proteasas (aprotinina 10 mg/ml, leupeptina 10 mg/ml, pepstatina 1ug/ml, NaF 41 mg/ml, Ortovanadato 18 mg/ml). Después de 15 min se recolectó el lisado de cada placa con la ayuda de un "cell scrapper", y se centrifugaron a 12000g por 10 min. Una vez finalizado se

transfirió el sobrenadante a un tubo limpio y se guardó a -20°C . Siguiendo el protocolo de BIORAD, se usaron 10 μl para la cuantificación de proteínas totales. Al resto, se le agregó un tercio del volumen total de buffer de carga (2%SDS, 10% Glicerol, Tris 0,06 M pH 6,8, 0,01% azul de bromofenol y 20% β -mercaptoetanol) y fueron denaturadas por 5 min a 70°C . Posteriormente, se cargaron 25 μg de proteína total a cada gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10%. Las proteínas fueron separadas completamente a 120V y una vez finalizada la corrida se transfirió durante 1 hora a 100 V a una membrana de PVDF (Thermo Scientific), previamente activadas en metanol. Se bloqueó las membranas con leche descremada al 5% en TBS-Tween 0,1% por una hora a temperatura ambiente. En el caso de phospho-JNK, se utilizó BSA al 5% en TBS-Tween 0,1%. Los anticuerpos primarios fueron incubados durante toda la noche a 4°C en TBS-Tween 0,1% a las respectivas diluciones: p-JNK (cell Signaling), dilución 1:1000; JNK total (Santa Cruz Biotechnology), dilución 1:1000; Osx (Santa Cruz Biotechnology), dilución 1:1000; y β -catenina (Transduction Laboratories), dilución 1:1000. Como control de carga, el anticuerpo para β -Actina (Sigma) a una dilución 1:5000 se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente.

Después de 16 horas de incubación, la membrana se lavó 3 veces por 10 min con TBS-Tween 0,1% y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente, anti-mouse peroxidasa y anti-rabbit peroxidasa (Rockland, Gilbertsville, U.S.A) a una dilución 1:5000 por una hora a temperatura ambiente. Finalmente, se repitió los 3 lavados y se procedió al revelado de las membranas con el kit quimioluminisciente de Pierce ECL (Thermo Scientific). Se cuantificó la intensidad de las bandas utilizando el programa Kodak Molecular Imaging Software.

6. Ensayo de proliferación celular con MTS

Se midió en duplicado la absorbancia relativa al número de células viables al tiempo cero, 3 y 6 días para hMSCs y 2 días para la línea celular SaOs-2, a través del ensayo colorimétrico utilizando el kit MTS/PMS de Promega (CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay). Células viables en la placa reducen el MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) y lo transforman en formazano generando el color rojizo característico. Células fueron tratadas con Wnt5a (500 ng/ul), anticuerpo anti Wnt5a (2ug/ml) y el inhibidor de JNK, SP600125 (20uM).

Se sembró 5000 células por pocillo en 100 µl de medio DMEM-SF10% de hMSCs y 30000 en placas de 24 pocillos de SaOs-2. Se agregó la mezcla de MTS/PMS y después de 1 hora a 37°C y 5% CO₂ se procedió a medir la absorbancia a 492 nm.

7. Tinción de hMSCs con Rojo de Alizarin

Para estudiar el efecto de la inhibición de la vía de las JNK y bloquear el efecto de Wnt5a endógeno sobre la diferenciación, se midió el depósito de calcio con la tinción de Rojo Alizarin (Sigma). Placas de 35 mm fueron sembradas en el centro con 40000 células en MO por 14 días. Luego de transcurrido el tiempo estipulado, las placas se lavaron 2 veces con PBS y se fijaron en etanol al 70% por 1 hora en hielo. Se incubó con Rojo de Alizarin 40 mM en buffer NaH₂PO₄ 0,01M a pH 4,3 por 10 min a temperatura ambiente. Se lavó el colorante con agua bidestilada 5 veces y finalmente por 3 minutos con PBS. Luego de fotografiar los depósitos se diluyó el colorante utilizando cloruro de cetilpiridina (Sigma) al 10% w/v en buffer fosfato de sodio 10 mM (pH 7,0) por 15 min en agitación a temperatura ambiente. Finalmente se transfirieron 100 µl a una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 560 nm.

8. Análisis Estadístico.

Se realizó para cada caso un ensayo de test de Student de dos colas. La diferencia es significativa, cuando el valor de p es menor a 0,05. Si se indica, este valor incluso puede ser menor a 0,02.

VI. RESULTADOS

1. Efecto de Wnt5a en la proliferación de hMSCs.

Antes de observar el efecto que tiene esta proteína Wnt no canónica sobre la diferenciación osteogénica, fue importante estudiar si tenía algún efecto en la viabilidad y la proliferación celular. Se evaluó la proliferación de células controles mediante el uso de MTS y se determinó el efecto de bloquear Wnt5a del medio con un anticuerpo específico contra éste y de inhibir la proteína JNK con el inhibidor SP600125. Como se observa en la figura 6, en un tiempo de 3 días, no hubo efecto en ninguna de las condiciones probadas. Sin embargo, a un tiempo más largo (7 días), se observó que en promedio la absorbancia relativa al número celular es significativamente mayor en aquellas células tratadas con el anticuerpo contra Wnt5a, en comparación a la condición de medio basal ($p=0,035$). Por el contrario, no se obtuvo el efecto opuesto al agregar Wnt5a al medio de cultivo, lo que era de esperar. El tratamiento de las células con el inhibidor redujo levemente la proliferación, aunque no fue estadísticamente significativo.

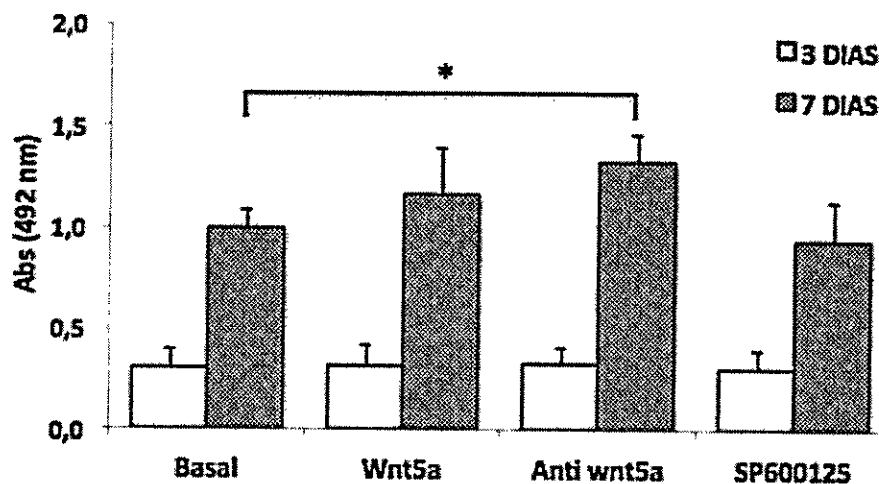


Figura 6. Efecto en la proliferación de hMSCs.

Células fueron tratadas por 3 y 7 días en medio basal o suplementado con Wnt5a (500 ng/ μ l), Anticuerpo anti Wnt5a (2 μ g/ml) y 20 μ M de SP600125. Las barras representan el promedio \pm SE de 4 muestras independientes en duplicado. La diferencia es significativa comparada al control basal (* $p<0.05$).

Estos experimentos fueron realizados en células mesenquimáticas controles en donde las pacientes no padecen de ningún otro tipo de condición. Sin embargo para obtener algún indicio del efecto de Wnt5a sobre la proliferación celular se realizó el mismo experimento pero en la línea celular de osteosarcoma SaOs-2. En este caso si se observa un efecto significativo de las condiciones probadas (Figura 7). La absorbancia promedio de las células iniciales fue de $0,44 \pm 0,048$. Al comparar este valor con la absorbancia para el control a 48 horas, este último aumentó cerca del doble ($0,7 \pm 0,041$) indicando la rápida tasa de replicación celular. El tratamiento con Wnt5a disminuyó significativamente la capacidad de replicación de las células SaOs-2, lo cual se revertió luego de bloquear el Wnt5a presente en el medio con el anticuerpo específico, resultado similar a lo obtenido en las C-hMSCs. Esto indicaría que cualquier aumento o disminución anormal en la expresión de Wnt5a podría tener un efecto sobre la proliferación celular. Además, la inhibición de la vía de señalización dependiente de JNK también disminuyó la proliferación celular, e incluso en presencia de Wnt5a en el medio de cultivo.

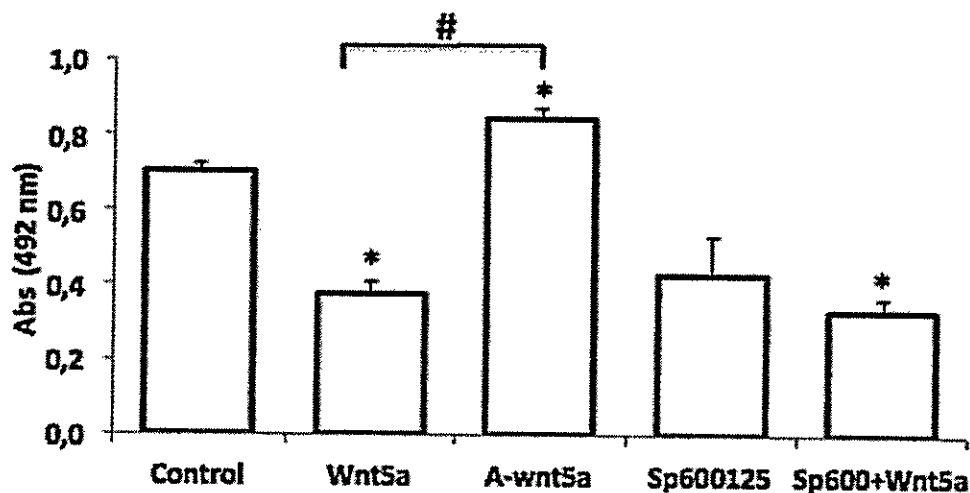


Figura 7. Efecto en la proliferación de SaOs-2.

Células tratadas por 48 horas en medio basal o suplementado con Wnt5a (500 ng/ul), Anticuerpo contra Wnt5a (2ug/ml), 10 μ M de SP600125, e inhibidor más Wnt5a. Las barras representan el promedio de 2 muestras en duplicado. las diferencias son significativas * $p < 0,02$ y # comparando entre los tratamientos con wnt5a y el anticuerpo.

2. Activación de phospho JNK a través de Wnt5a en hMSCs.

De los antecedentes de la literatura, JNK es activada por Wnt5a en modelos como *Drosophila*, *Xenopus* y pez cebra. Para determinar el efecto en células hMSCs, se procedió a medir en el tiempo si este ligando era capaz de inducir la fosforilación de JNK. Células controles en medio basal fueron tratadas por 15, 30 y 60 min con 500 ng/μl de Wnt5a. Como se observa en la Figura 8, tanto la isoforma de 55kDa como la de 46 kDa fueron fosforiladas en presencia del estímulo en comparación a los controles. Se observa que la isoforma p55 presenta un peak de fosforilación temprano (15min) y decae con el tiempo, a diferencia de la isoforma p46 la cual presentó un peak a los 30 min. En ambos casos las diferencias en la cantidad relativa de proteína fosforilada entre tratados y controles fueron estadísticamente significativas.

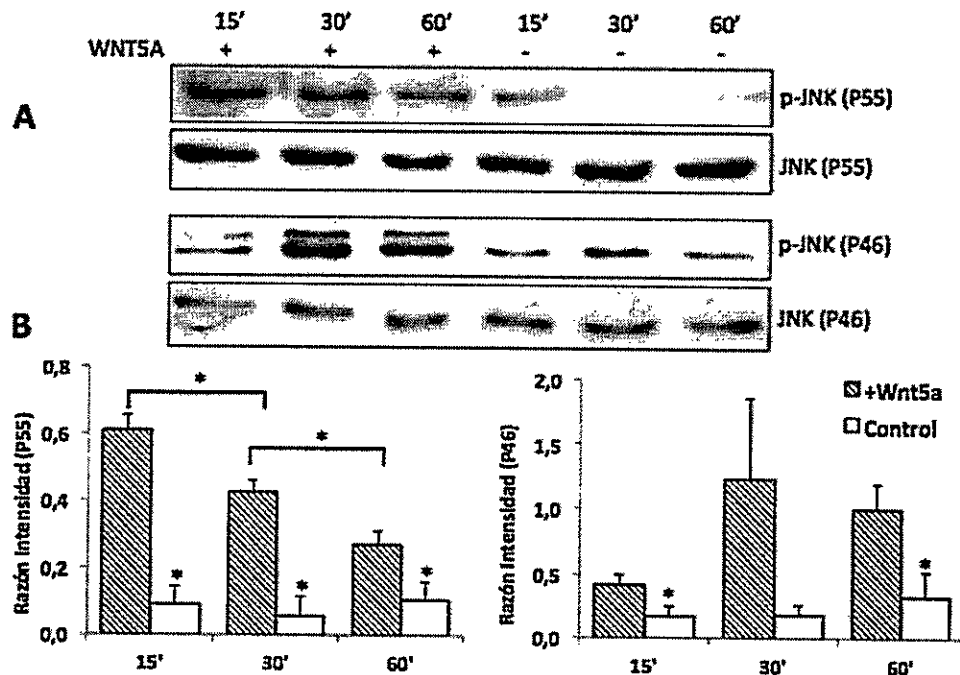


Figura 8. Efecto de Wnt5a sobre la fosforilación de JNK en C-hMSCs.

A. Western Blot de p-JNK para las isoformas P55 y P46 con respecto a JNK total. hMSCs controles fueron tratadas por 15, 30 y 60 min con (+) o sin (-) Wnt5a (500ng/μl). **B.** Cuantificación de la intensidad relativa de p-JNK. Las barras representan el promedio de 3 muestras independientes (* p < 0,05).

Para asegurar que efectivamente el compuesto SP600125 inhibe la fosforilación de JNK y por ende la vía de señalización, las células fueron tratadas con 20 μ M por 30 min y 5 horas. Para evaluar si la inhibición de JNK bloquea la activación por Wnt5a el inhibidor se lavó y se agregó luego el estímulo de Wnt5a. Como era de esperar, en este último caso la activación de JNK no es significativa, siendo similar al caso control (Figura 9, línea 1). No así la activación por parte del estímulo sólo (línea 2) la cual es evidente al comparar con el control. Además, claramente para p-JNK (P46) la inhibición por sólo 30 min es suficiente para incluso bloquear la activación basal de la célula. Por último, se probó si los componentes del MO activan a JNK a tiempo corto (30 min). Se observa que existiría una fosforilación basal mínima, sin embargo es similar a la observada en el caso control, por lo que probablemente los componentes del propio medio osteogénico no activarían la vía durante un período de exposición mayor.

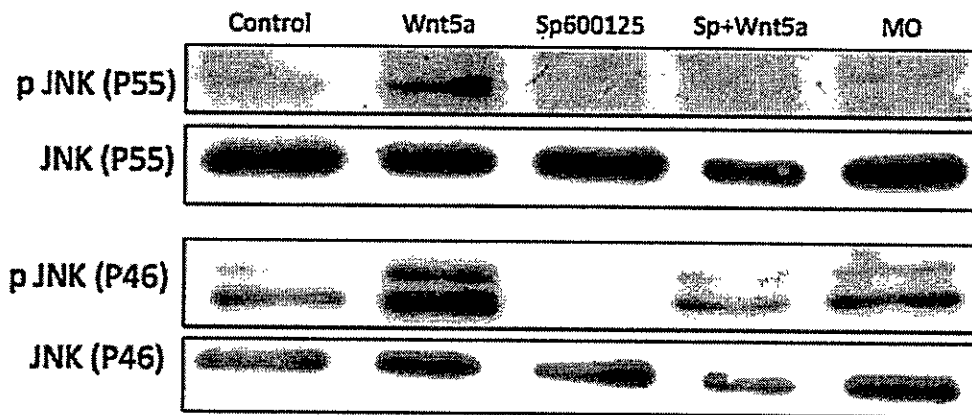


Figura 9. Wnt5a no activa a JNK en C-hMSCs en presencia de SP600125.

Se midió la fosforilación de las dos isoformas de JNK, p-JNK (P55 y P46). Línea 1: Control, células cultivadas en medio basal. Línea 2: Estímulo de Wnt5a por 30 min. Línea 3: 20 μ M de SP600125 por 30 min. Línea 4: 20 μ M de SP600125 por 5 horas y luego 30 min del estímulo Wnt5a. Línea 5: Células tratadas con MO por 30 min.

3. Efecto de Wnt5a en la expresión de genes osteogénicos en hMSCs.

Se estudió el efecto de Wnt5a, el anticuerpo contra Wnt5a y el inhibidor de JNK en la expresión de genes relacionados con el proceso de diferenciación osteogénica. Tanto *alp*, *ror2*, *runx2*, *osx*, *opn* y *bsp* fueron analizados en MO por 4 y 8 días (Figura 10).

El receptor Ror2 presenta una expresión mínima en células cultivadas en medio basal. Sin embargo la expresión aumenta al diferenciar hMSCs con MO por 4 días. Además, el aumento de la concentración de Wnt5a en el medio pareció favorecer aún más la expresión del receptor. Por el contrario, ni la presencia del anticuerpo contra Wnt5a ni del inhibidor de JNK tendría efecto evidente ya que en promedio la expresión fue similar a la observada en aquellas células cultivadas sólo en medio osteogénico.

Como era de esperar, la expresión de *alp* aumentó en hMSCs expuestas a medio de diferenciación osteoblástico (MO) en comparación a la situación control. Sin embargo en los tratamientos con Wnt5a y anticuerpo no se observó efecto, mientras que la inhibición de JNK disminuyó la expresión del gen (Figura 10).

A pesar de que la expresión de *runx2* no se vió afectada por ninguno de los tratamientos, la expresión de *osx* aumentó considerablemente en presencia de Wnt5a y en menor cantidad con el anticuerpo. Mas aún, la presencia del inhibidor de JNK disminuyó los niveles de *osx* drásticamente, alcanzando incluso valores similares a los obtenidos para el control basal. Este efecto se observó tanto a 4 como a 8 días de diferenciación (datos no mostrados). Este resultado indica que la presencia de Wnt5a favorecería la expresión de *osx* y en gran parte la expresión de éste está regulada por la activación de la vía dependiente de JNK.

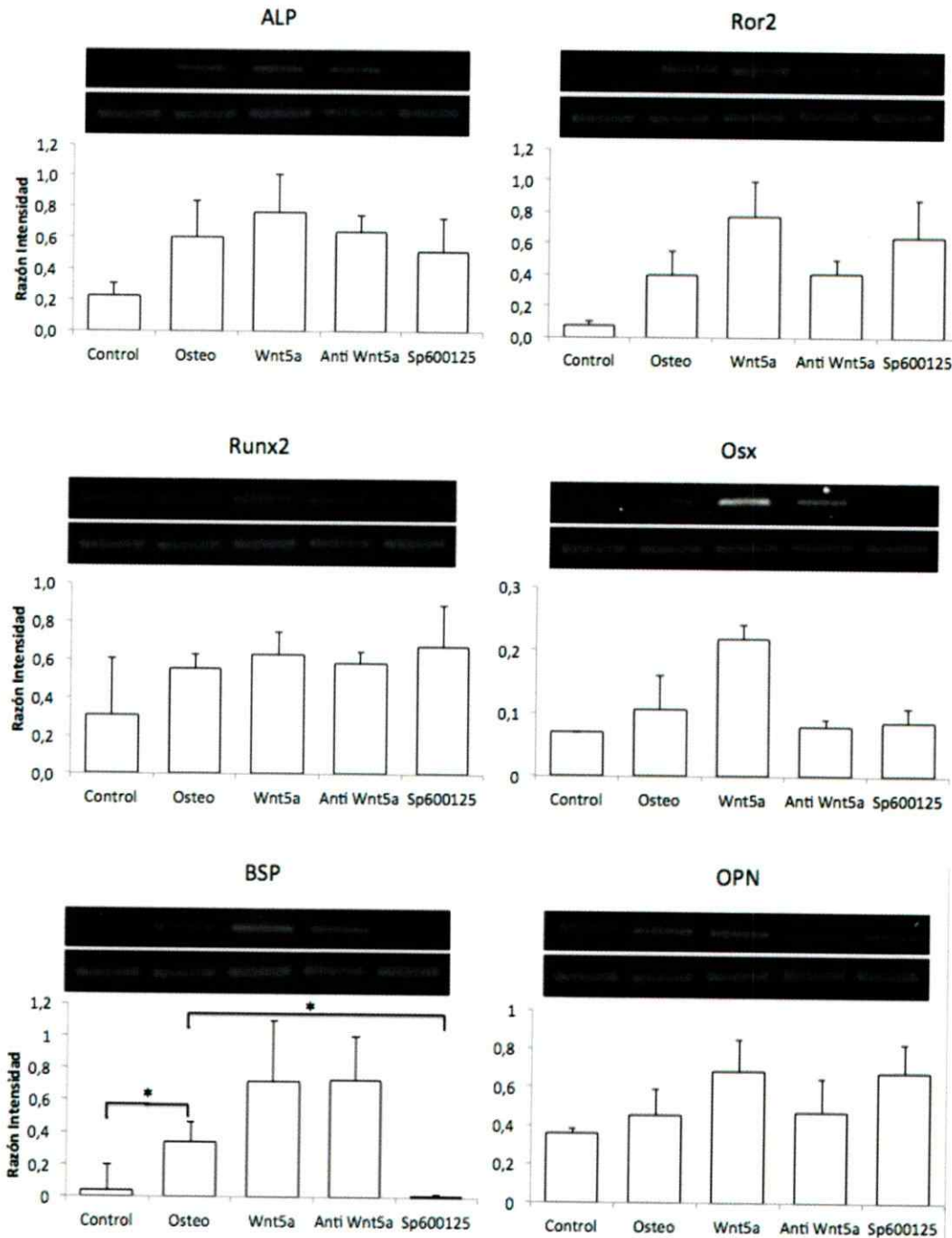


Figura 10. Expresión de genes osteogénicos en hMSCs.

Se evaluó la expresión de *alp*, *ror2*, *runx2* y *osx* en MO suplementado con Wnt5a (500ng/ μ l), anticuerpo anti Wnt5a (2ug/ml) y SP600125 (20uM) por 4 días, y 8 días en las mismas condiciones para los genes de expresión tardía *opn* y *bsp*. Como control de carga se utilizó el gen para 18S (banda inferior). Los gráficos representan el promedio \pm SE de 4 muestras independientes (* $p < 0.05$). Se muestran resultados representativos en cada caso.

La sialoproteína de hueso (BSP) y osteopontina (OPN) son típicos marcadores osteogénicos de un estadio más avanzado del proceso de diferenciación a osteoblasto maduro. La figura 10 muestra los resultados obtenidos luego de 8 días en diferenciación. BSP aumentó su expresión en células cultivadas en MO y aún más en presencia de Wnt5a y, a la vez, fue casi nula en presencia del inhibidor de JNK. Resultado similar al obtenido para la expresión de *osx*.

Por último, a pesar de que en presencia de Wnt5a la expresión de *opn* aumenta, este resultado no es significativo. Además al parecer la proteína de JNK no sería necesaria para generar un aumento en la expresión del gen durante la diferenciación a osteoblastos. Estos resultados contradicen ciertos antecedentes que indican que el promotor de *opn* estaría regulado por Wnt5a (Bilkovski et al., 2010).

4. Evaluar el efecto de Wnt5a en el nivel de la proteína Osterix, y de β -Catenina en hMSCs.

Los resultados anteriores sugiere fuertemente que Wnt5a favorecería la expresión del gen para *Osx* y que la inhibición de JNK disminuiría su expresión en comparación al control osteogénico. Como se observa en la figura 11, los niveles de la proteína *Osx* fueron similares a los obtenidos con los niveles de mRNA. *Osx* aumentó casi 3 veces la expresión cuando las células fueron cultivadas en medio osteogénico por 48 horas. Además, al tratar los cultivos con 500 ng/ μ l de Wnt5a, la expresión aumentó alrededor de 2 veces en comparación a los niveles en MO. Por el contrario, el anticuerpo contra Wnt5a no tuvo efecto, aunque en algunas muestras la expresión del gen disminuyó hasta valores comparables a la condición basal. Por último, la inhibición de JNK disminuyó significativamente la expresión de *Osx* a alrededor de un 50% en comparación al control con MO, llegando a niveles

similares a los obtenidos a células no diferenciadas cultivadas en medio basal (Figura 11).

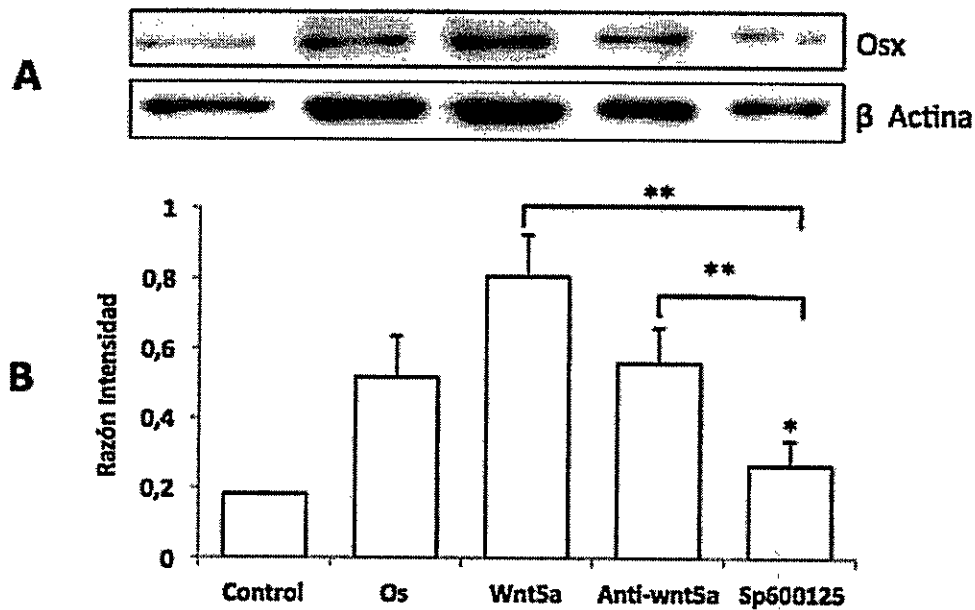


Figura 11. Wnt5a incrementa la expresión de Osx y su expresión depende de JNK en C-hMSCs.

A. Western blot de células control, tratadas por 48 horas en MO, MO más Wnt5a (500 ng/ μ l), anticuerpo Wnt5a (2 μ g/ml) o SP600125 20 μ M. Como control de carga se utilizó β Actina. **B.** Cuantificación de la intensidad relativa de Osx. Las barras representan el promedio \pm SE de 3 muestras independientes. Las diferencias son significativas en comparación al control Osteogénico * p < 0,05 y ** p < 0,02 al comparar los tratamientos Wnt5a y anti-Wnt5a con Sp600125.

Por otro lado, estudios de otros grupos han demostrado que Wnt5a tendría efecto sobre la vía wnt canónica. En la mayoría de los casos Wnt5a tendría un efecto negativo; sin embargo, su verdadero efecto no es claro y se desconoce los mecanismos involucrados. Más aún, poco se conoce sobre el efecto que tendría en hMSCs. Por esta razón, se analizó si Wnt5a tendría algún efecto sobre la proteína β -catenina. Células controles fueron tratadas por 48 horas en MO en las condiciones experimentales usadas anteriormente. Los resultados obtenidos sugieren que tanto el tratamiento con Wnt5a como con el inhibidor de JNK podrían

disminuir la expresión de β -catenina en comparación a la condición control (Figura12). Sin embargo, son necesarios más experimentos para determinar que estas diferencias sean significativas.

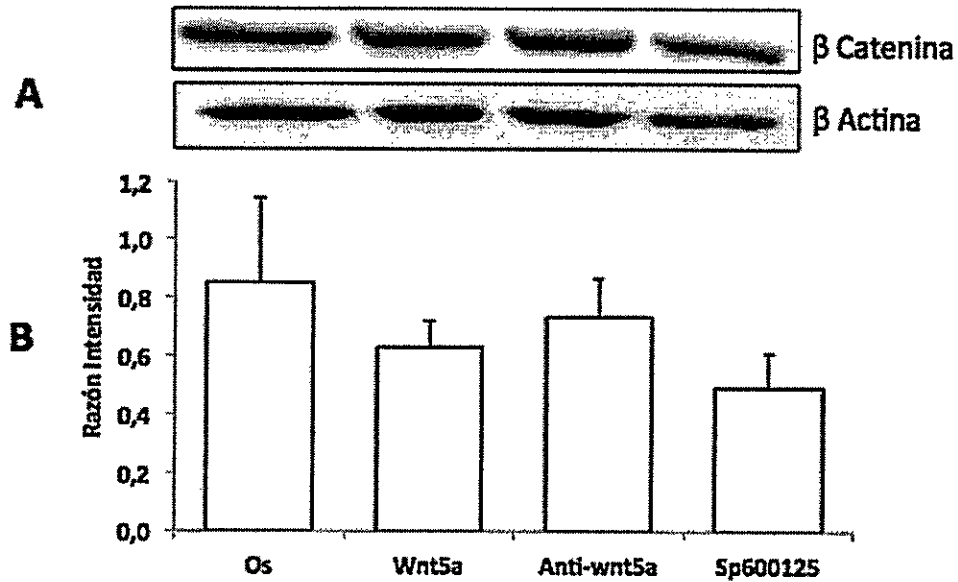


Figura 12. Wnt5a no tiene un efecto sobre β -catenina en hMSCs.

A. Western blot de células tratadas por 48 horas en MO, MO más Wnt5a (500 ng/ μ l) o Anti Wnt5a (2 μ g/ml) o SP600125 20 μ M. Como control de carga se utilizó β actina. B. Cuantificación de la intensidad relativa de β -catenina. Las barras representan el promedio \pm SE de 4 muestras diferentes.

5. Estudiar el efecto de la inhibición de JNK sobre la diferenciación osteogénica.

Se evaluó si la inhibición de JNK y el bloqueo de Wnt5a con el anticuerpo específico, tenían algún efecto en el depósito de calcio en hMSCs cultivadas en medio osteogénico por 14 días mediante la tinción con rojo de alizarin. Como se muestra en la figura 13, el mayor depósito de calcio se observa en las células cultivadas en medio osteogénico. La neutralización de Wnt5a presente en el medio de cultivo o la inhibición de la vía de las JNK, disminuyó significativamente el

depósito de calcio. Los valores de absorbancia obtenidos por la extracción con cloruro de cetilpiridina se correlacionan con los resultados observados en las microfotografías de cada placa. Una mayor coloración se observó en el control de diferenciación osteogénico (a esa absorbancia promedio se le dio un valor de uno) comparadas con las placas tratadas con anticuerpo o inhibidor. En ambos casos, la absorbancia relativa fue alrededor de un 60% menor en comparación al control osteogénico. Como se observa en la figura la condición basal sin medio de diferenciación, presentó una coloración de alrededor de un 20% del total obtenido en el MO.

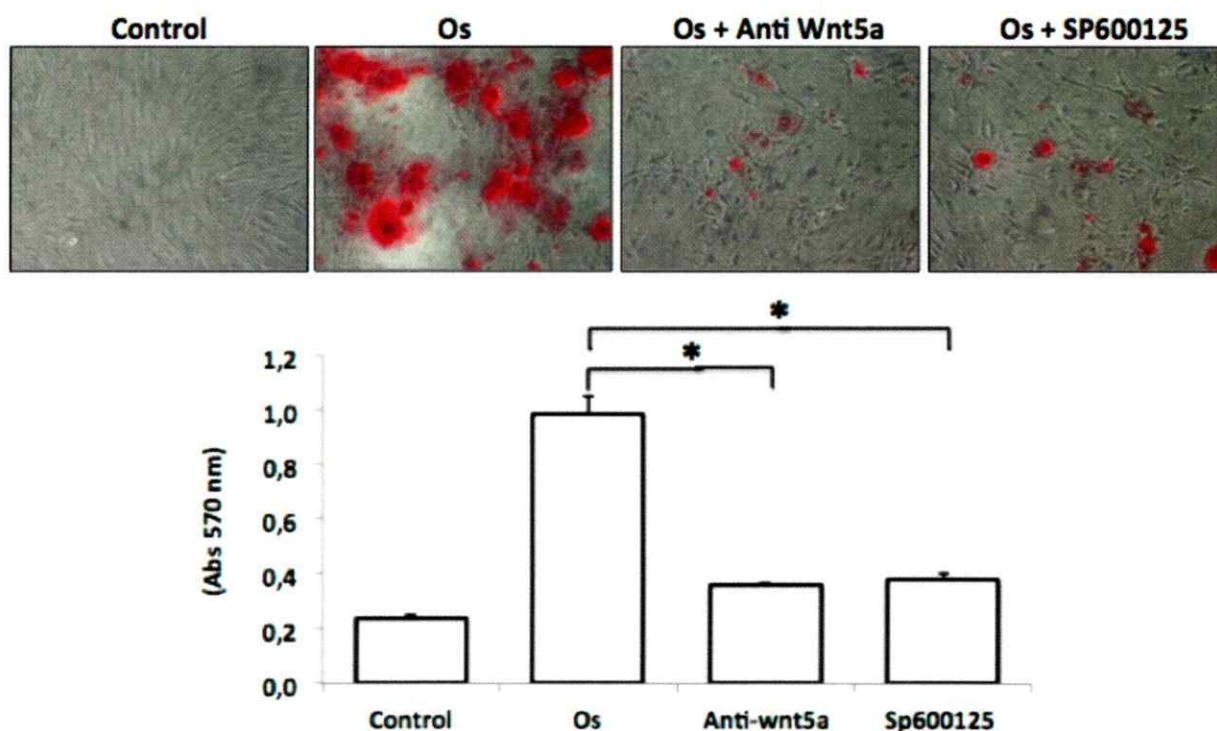


Figura 13. Efecto de SP600125 y del anticuerpo contra Wnt5a en el desarrollo de depósitos de calcio en hMSCs.

Luego de 14 días con MO, MO+ Anti wnt5a (2ug/ml), MO+SP600125 (20uM) se tiñó con Rojo Alizarin y se extrajo el colorante con cloruro de cetilpiridina. Las fotos representan a una muestra de un n=3 y la absorbancia relativa se realizó en triplicado a 570 nm. Estadísticamente significativo * $p < 0,05$. Aumento 100x.

6. Expresión de Ror2 y Wnt5a en hMSCs controles y osteoporóticas.

Como estudios preliminares se evaluó si existen diferencias en la expresión de los genes *wnt5a* y el receptor *ror2* en células que se obtuvieron de hMSC donantes controles y osteoporóticas. Esto se realizó mediante PCR en tiempo real, determinando la expresión relativa del gen a través del método de curva estándar. Como se observa en la Figura 14, *wnt5a* se expresa tanto en células proveniente de pacientes osteoporóticas (O-hMSCs) como controles (C-hMSCs) en condición basal (DMEM+SF10%). Sin embargo, las células controles parecieran expresar alrededor de un 40% más de Wnt5a que las osteoporóticas, aunque esta diferencia no fue significativa ($p=0,18$). El receptor de membrana *ror2* se expresa al igual que la proteína Wnt5a, igualmente en células provenientes de pacientes osteoporóticas como controles, pero sin diferencia significativa ($p=0,47$).

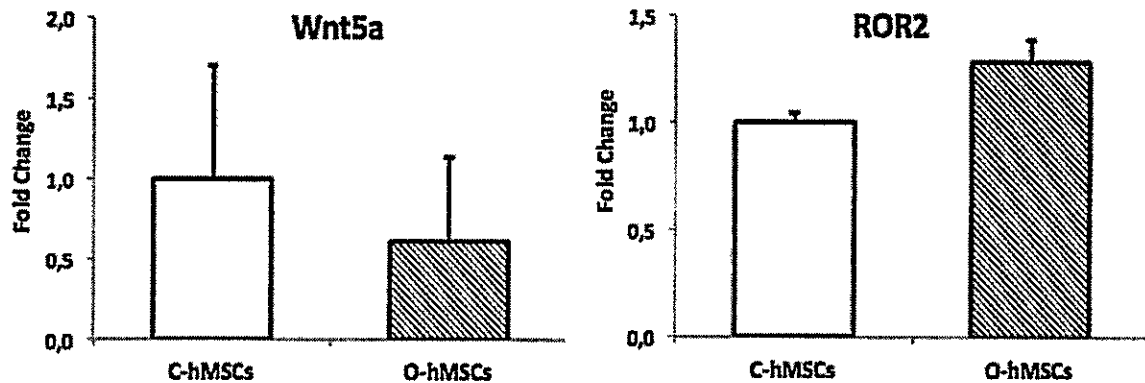


Figura 6. Expresión de Wnt5a y Ror2 en O-hMSCs y C-hMSCs.

Se midió la expresión para Wnt5a y Ror2 en células cultivadas en medio basal (DMEM+SF10%) mediante SYBR Green PCR. Los gráficos representan el promedio \pm SE de 6 muestras independientes.

VII. DISCUSIÓN

En este trabajo se estudió el efecto de la proteína Wnt5a, ampliamente conocida en organismos como *Xenopus* o *Drosophila*, por ser capaz de activar vías Wnt no canónicas (Nomachi et al., 2008; Oishi et al., 2003; Schambony and Wedlich, 2007). En los últimos años, ciertas evidencias han sugerido la función de esta proteína en la diferenciación de MSCs a osteoblastos y la inhibición hacia la adipogénesis (Bilkovski et al., 2010; Liu et al., 2008). Sin embargo, aún no está claro si Wnt5a es necesaria o suficiente para dirigir el proceso. Más aún, a pesar de que se conoce la capacidad de activar vías dependientes de JNK y/o PKC/Ca²⁺, la vía específica utilizada durante la diferenciación osteogénica aún se desconoce.

El objetivo de este seminario de título fue estudiar con mayor detalle el efecto de Wnt5a y la relevancia de JNK sobre la diferenciación osteogénica de hMSCs obtenidas de donantes postmenopáusicas. En términos generales, Wnt5a tiene un efecto positivo sobre la diferenciación a osteoblastos y, además, es capaz de estimular la fosforilación de JNK. Tanto la expresión de genes tempranos como tardíos característicos de la osteogénesis como *osx* y *bsp* aumentan en presencia de Wnt5a y disminuyen cuando la vía no canónica dependiente de JNK está bloqueada. Además, el depósito de calcio luego de 14 días en medio de diferenciación OS disminuye drásticamente en presencia del inhibidor de la JNK o con el anticuerpo anti Wnt5a. Por otro lado, se analizaron los posibles efectos de Wnt5a sobre la proliferación celular y los nivel de β -catenina.

1. Ror2, Wnt5a, JNK y Osteogénesis

Nuestros resultados muestran que Ror2 se expresa en células mesenquimáticas no diferenciadas, independiente si provienen de pacientes osteoporóticos o controles (Figura 14). Esto indica que aunque existe una expresión

basal de este receptor, los niveles de mRNA aumentan cuando las células son expuestas a medio osteogénico (figura 10). Estos resultados concuerdan con otro trabajo donde la expresión de Ror2 es casi indetectable en células pluripotentes, alcanzando un peak de expresión en preosteoblastos y decayendo en estadios avanzados como osteocitos (Billiard et al., 2005), lo que sugiere que existiría una regulación positiva a medida que comienza el proceso de diferenciación. Por otro lado, en células que no expresan Ror2 o presentan alguna mutación en el sitio con actividad tirosina quinasa, la diferenciación osteogénica se ve disminuida en comparación al control (Liu et al., 2007).

La expresión del receptor aumenta aún más en aquellas células tratadas con Wnt5a (figura 10). A pesar de que este resultado no sería estadísticamente significativo, existen evidencias que lo apoyan. Por ejemplo, un aumento en la expresión del receptor Ror2 está correlacionado con la regulación positiva para el gen de *Wnt5a* en la línea celular de eritroleucemia humana K562 (Yuan et al., 2011).

Por otro lado, células controles expresan más Wnt5a que células provenientes de pacientes osteoporóticos (figura 14). Esto concuerda con otros resultados de nuestro laboratorio, en donde los niveles de expresión de algunos componentes de la vía Wnt canónica se encuentran disminuidos en células de pacientes osteoporóticas en comparación a hMSCs controles, como es el caso de LRP6 y GSK-3 β (datos no mostrados). Esto sugiere que tal vez MSCs de pacientes osteoporóticos presenten como una predisposición un nivel de expresión de genes relacionados a las vías Wnt menor que en las células controles, por ende una menor capacidad de diferenciación hacia el linaje osteogénico.

Suponiendo que Wnt5a efectivamente aumente su expresión en medio osteogénico, lo que ocurre después de eso permanece incierto. El receptor unido al ligando es capaz de gatillar la activación de una serie de proteínas como GTPasas, proteínas quinasas e incluso inhibir la acción de β -catenina. Debido a esto, sólo se evaluó la inhibición de JNK y se observó que Wnt5a en presencia del inhibidor SP600125 no es capaz de inducir la fosforilación de JNK, por lo que el factor de transcripción c-JUN no podría ser activado (Figura 9). Por el contrario, Wnt5a por si solo es capaz de fosforilar a JNK para ambas isoformas (figura 8).

La inhibición de la actividad de JNK presenta efectos evidentes en la diferenciación osteogénica de hMSCs. Células cultivadas en medio suplementado con el inhibidor de JNK o con el anticuerpo anti Wnt5a presentan una mineralización reducida en alrededor de un 60% en comparación al control osteogénico luego de 14 días en medio de diferenciación (Figura 13). La relevancia de la vía Wnt no canónica en el desarrollo de la osteogénesis puede atribuirse a los diferentes efectos de JNK en la célula. En organismos como *Drosophila* o *Xenopus*, JNK tiene un rol fundamental en el remodelamiento del citoesqueleto, lo que interesantemente no se encuentra alejado del proceso de diferenciación de hMSCs a osteoblastos. En el trabajo de Kilian y col. (2010) se demuestra que ciertos rasgos geométricos que aumentan la contractibilidad de la célula promueven la osteogénesis y son consistentes con características *in vivo* del microambiente de células diferenciadas. Es decir, un citoesqueleto más contráctil promueve la diferenciación hacia osteoblastos mientras que formas de áreas similares que no permiten contractibilidad favorecen un resultado adipogénico. Además, resultados de microarreglos sugieren que un aumento en la contractibilidad de miosina favorece la osteogénesis a través de las vías de las MAP quinasas y de las proteínas Wnt. Por ende la forma celular y/o Wnt5a pueden aumentar los niveles de GTPasa la cual finalmente se encarga de la tensión del citoesqueleto (McBeath et

al., 2004). Lógicamente al igual que la densidad, la morfología celular sería relevante, ya que entre más extendidas las células, mayor es la facilidad para depositar calcio durante el proceso de remodelamiento óseo y entre más esféricas mayor la capacidad de almacenar lípidos. Esto explicaría que cambios en la morfología celular debido a la inhibición de JNK podrían estar relacionados con la baja formación de nódulos de mineralización en etapas tardías de diferenciación a osteoblastos maduros.

2. La expresión de *Osx* aumenta en presencia de *Wnt5a* y depende de JNK

Dos proteínas centrales de la diferenciación osteogénica son los factores de transcripción *Runx2* y *Osterix*. El gen para *runx2* puede ser activado por una serie de moléculas pero según nuestros resultados, *Wnt5a* al igual que JNK no tendrían un efecto sobre los niveles de mRNA. Esto se debe a que su expresión depende principalmente de la proteína BMP2 y la posterior activación de la vía de las Smads (Javed et al., 2008). BMP2 podría catalogarse como un ligando maestro y esencial para gatillar la diferenciación a osteoblastos. En la vía convencional, BMPs se unen a los receptores tipo II y tipo I para inducir la fosforilación de Smads 1/5/8, capaces de formar un complejo con Smad4 para luego translocarse al núcleo y activar la expresión de *runx2* (Figura 15). Además, BMP2 y *Runx2* son capaces de interactuar físicamente para estimular la expresión de otros factores de transcripción como *Dlx5* y *Osx* (Chen et al., 2012). La expresión de *runx2* también puede ser regulada por vías independientes a las Smads, a través de TAK1 y la MAP quinasa p38 (Chen et al., 2012).

Esto explicaría que tanto JNK como la proteína *Wnt5a* no tengan un efecto sobre *runx2*. Sin embargo, los resultados para la expresión de *Osx* tanto a nivel de mRNA como de proteína son diferentes. A tiempos cortos de diferenciación (4 días)

Wnt5a aumenta la expresión de *osx*; esto también se observó a 8 días de diferenciación (datos no mostrados). Por el contrario, el tratamiento con el inhibidor de la fosforilación de JNK disminuye considerablemente los niveles tanto de mensajero como de proteína (Figura 10 y 11).

Los niveles proteicos de *Osx* en células tratadas con el anticuerpo contra Wnt5a son similares a los obtenidos en células cultivadas sólo con medio osteogénico. Esto puede deberse a que la cantidad de anticuerpo utilizada no haya sido la suficiente y que algún remanente de ligando sea suficiente para gatillar la expresión o que Wnt5a no es la única molécula que regula la expresión de *osx*. Esto último concuerda con los antecedentes ya expuestos; *Osx* puede ser activada por la vía convencional BMP2-Runx2 (Chen et al., 2012), e incluso por otros estímulos como IGF-1 a través de una serie de mecanismos que involucran diferentes proteínas como p38, proteínas Ras y PKD (Celil and Campbell, 2005). Estímulos como IGF-1 y BMP requieren de las tres MAPKs para activar la expresión de *osx* lo que explica la baja expresión de éste en las células tratadas con el inhibidor de JNK. Este análisis puede respaldar el hecho de que el uso del anticuerpo anti Wnt5a no tenga un efecto significativo en los genes osteogénicos. Sin embargo, el depósito de calcio se ve dramáticamente disminuido al bloquear el Wnt5a circulante.

Debido a que *Osx* como factor de transcripción, es capaz de regular la expresión de otros genes osteogénicos como fosfatasa alcalina y BSP, esto explicaría una expresión disminuida en las células cultivadas en presencia del inhibidor (Figura 10). Ya que *osx* depende de JNK, genes relacionados a etapas más tardías en la diferenciación como BSP también se ven afectados.

La sialo proteína de hueso (BSP) es uno de los principales marcadores de tejido óseo ya que es un componente necesario y abundante de tejidos mineralizados. Junto a osteopontina (OPN), ambas fosfo-proteínas no colagenosas,

están relacionadas con el depósito de cristales de hidroxapatita por un mecanismo no del todo resuelto. En presencia del inhibidor de JNK por 8 días, BSP disminuye su expresión significativamente en comparación al control osteogénico. Este resultado es fundamental al comparar los bajos niveles de depósito de calcio, ya que BSP está directamente relacionada con la mineralización de la matriz extracelular, por lo que la vía no canónica dependiente de JNK sería necesaria, al menos, para los eventos más tardíos del proceso de diferenciación. Sin embargo, el efecto de Wnt5a sobre osteopontina no es evidente a pesar de que existen reportes que afirman lo contrario. Al menos en la línea celular de ratón C3H10T1/2, Wnt5a induce la actividad del promotor de OPN mediante la actividad de JNK (Bilkovski et al., 2010).

En la figura 15 se muestra un modelo posible que resume la vía principal relacionada a la diferenciación de MSCs a osteoblastos y el posible rol de Wnt5a y la posterior activación de la vía Wnt no canónica dependiente de JNK. En el estroma celular, MSCs se diferencian al linaje osteogénico principalmente debido al ligando BMP2, el cual favorece el aumento en la expresión de *runx2*. Sin embargo, la vía Wnt no canónica puede surgir como un complemento necesario para gatillar el paso de preosteoblastos a osteoblastos maduros capaces de mineralizar el estroma (Figura 15 y 16). Este efecto puede ser a través de la unión de Wnt5a al receptor Ror2 que, junto a algún receptor FDZ específico, forman un complejo que intracelularmente activarían, mediante una cascada de MAPKs, a JNK. Una vez fosforilado, p-JNK sería capaz de activar a c-JUN, factor de transcripción que forma parte del complejo AP1, favoreciendo la expresión de genes como *Osx* y *BSP*, lo que permitiría la diferenciación a osteoblastos maduros. Por otro lado, a través de un mecanismo aún desconocido Wnt5a podría regularía positivamente el gen para *Ror2* durante la diferenciación osteogénica en donde posiblemente la vía Wnt no

canónica dependiente de calcio este involucrada ya que según los resultados de PCR la expresión de Ror2 no se vió afectada por el inhibidor de JNK (Figura 10).

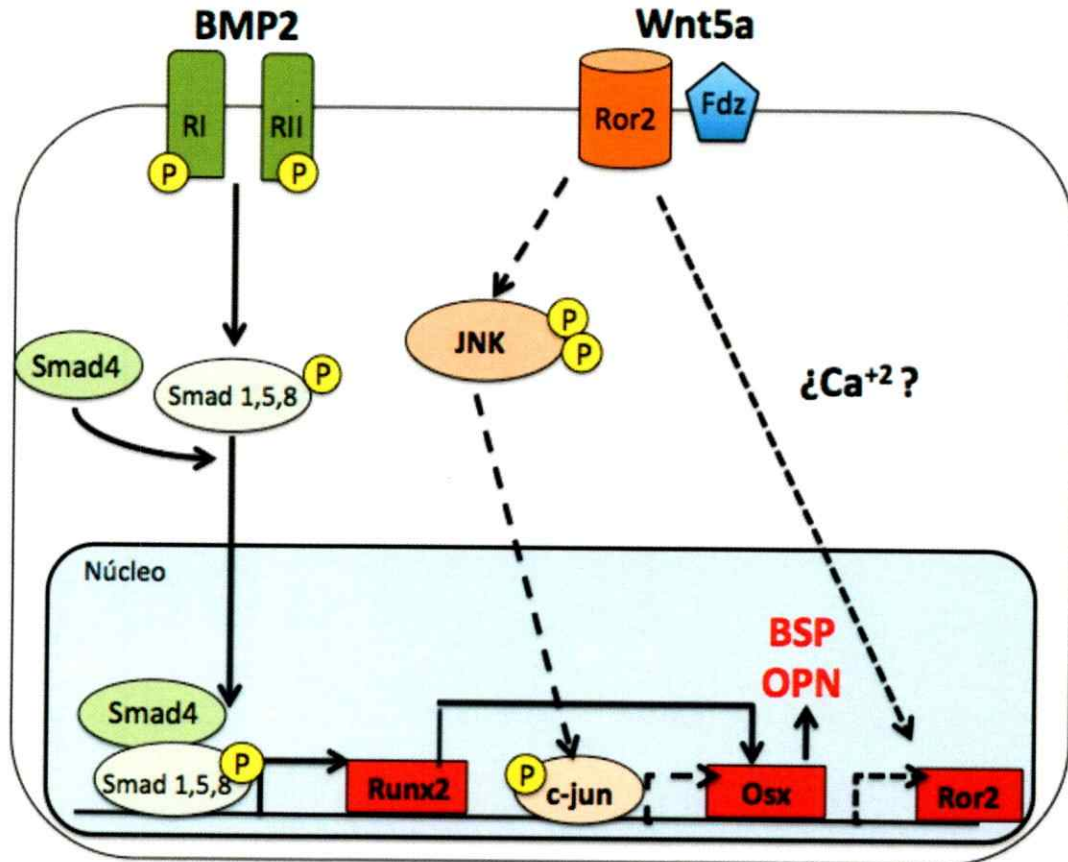


Figura 7. Wnt5a activa la vía Wnt no canónica dependiente de JNK durante la diferenciación osteogénica de MSCs. En la vía principal relacionada a la diferenciación a osteoblastos, BMP2 incrementa la expresión de Runx2, a través de la vía de las smads. A su vez, Runx2 es capaz de aumentar la expresión de osx, necesario para el paso de preosteoblastos a osteoblastos maduros. Como una vía complementaria, Wnt5a unido a Ror2 genera la activación de la vía JNK la cual fosforila a c-Jun, aumentando la expresión de Osx él cual puede favorecer la expresión de marcadores tardíos de diferenciación como BSP. Por un mecanismo aún desconocido durante la diferenciación, wnt5a podría favorecer la expresión del receptor Ror2.

3. Wnt5a, β -catenina y proliferación

Se estudió si Wnt5a tiene algún efecto sobre la vía Wnt canónica. Tanto Wnt5a como la inhibición de JNK no tendrían un efecto sobre los niveles de β -

catenina (Figura 12). Este resultado concuerda con estudios de tumorigénesis en la línea celular k562, donde Wnt5a no tiene efecto en los niveles de expresión, pero sí regula la fosforilación y la translocación de β -catenina desde el citoplasma al núcleo (Yuan et al., 2011), resultado similar se obtuvo anteriormente en el trabajo de Mikels y Nusse (2006). Al parecer, Wnt5a es capaz de inhibir la vía Wnt dependiente de β -catenina a través de diferentes mecanismos (Ishitani et al., 2003; Topol et al., 2003) sin embargo se debe considerar el contexto celular. Por ejemplo aparte de ejercer un rol inhibitor en presencia de Ror2, Wnt5a es capaz de activar la vía de señalización de β -catenina en presencia del receptor Frizzled 4 (Mikels and Nusse, 2006). A pesar de esto, aun existe controversia a través de que vía o vías de señalización Wnt5a es capaz de inhibir la señalización de β -catenina más aún en MSCs.

La vía Wnt canónica tiene un rol central en la renovación celular ya que muchos genes como *ciclinaD1* y *c-myc* dependen de la regulación de β -catenina. Alteraciones en proteínas como en APC, axina y la propia β -catenina se observan en varios tipos de tejidos cancerígenos. En cánceres de estómago, pulmón, mama y melanoma se observan niveles elevados anormales de Wnt5a (Liang et al., 2003). Sin embargo, evidencias demuestran un posible rol supresor de Wnt5a debido a la capacidad de suprimir la expresión de genes relacionados al ciclo celular en líneas celulares cancerígenas, a través de las vías Wnt no canónicas (Liang et al., 2003; Yuan et al., 2011). Además, análisis en la mayoría de las muestras de pacientes con leucemias primarias revelan que no expresan el gen para Wnt5a y/o una supresión en la expresión de la proteína. Tomando en cuenta estas evidencias, se analizó el efecto de Wnt5a sobre la proliferación en células de donantes cultivadas en medio basal suplementadas sólo con los tratamientos ya descritos. De los resultados obtenidos, luego de 3 días, no se observa efecto en ninguno de los casos (figura 6). Sin embargo después de 7 días de tratamientos, el anticuerpo

contra Wnt5a en el medio celular aumenta significativamente la proliferación de hMSCs (figura 8). Esto concuerda con los últimos antecedentes aportados. Al parecer la expresión de Wnt5a en hMSCs no diferenciadas sería necesario para mantener en niveles normales la proliferación celular. Sin embargo, el efecto no es evidente ya que al tratar las células con Wnt5a exógeno no se observa el efecto contrario, una disminución en la proliferación.

Para ayudar a dilucidar este tema, se usó la línea celular SaOS-2, ya que ha sido ampliamente utilizada para estudiar la diferenciación a osteoblastos y además proviene de un sujeto diagnosticado con osteosarcoma. Como se observa en la figura 7, los resultados concuerdan con el posible rol supresor de Wnt5a. Luego de 48 horas, aquellas células tratadas con la misma concentración de Wnt5a que en el caso de hMSCs, proliferan menos en comparación al control. Mas aún, se observa el efecto contrario al bloquear con el anticuerpo específico para Wnt5a. Por último, a pesar que un cierto porcentaje celular muere producto de la exposición al inhibidor, el efecto supresor de Wnt5a no sería a través de JNK ya que al ser administrada en conjunto con Wnt5a suprime de igual forma la proliferación celular, por lo que probablemente puede estar involucrada la vía Wnt no canónica PKC/Ca²⁺.

Como se observa en la figura 16, en conjunto todas estas evidencias y resultados sugieren que la vía wnt canónica se encuentra encendida en MSCs aún no comprometidas a un linaje celular en particular. Sin embargo, a medida que comienza el proceso de diferenciación, Wnt5a a través de Ror2 favorece la activación de la vía Wnt no canónica dependiente de JNK favoreciendo la expresión de genes osteogénicos y la posterior mineralización de la matriz. Además, Wnt5a sería capaz a través de un mecanismo que se cree estar relacionado con proteínas calcio sensitivas, como PKC y CAMKII, sería capaz de bloquear la translocación al

núcleo de β -catenina, señalando el rol supresor de Wnt5a sobre β -catenina y por ende sobre genes relacionados al ciclo celular.

Como proyecciones estos resultados son una antesala para determinar si las vías de señalización Wnt no canónica, particularmente JNK están relacionadas a enfermedades como el caso de la osteoporosis. Interesante sería estudiar si existen diferencias en esta vía entre células obtenidas de pacientes controles y osteoporóticos, además de profundizar el posible rol inhibitorio de Wnt5a sobre la proliferación e inhibición de la vía Wnt canónica.

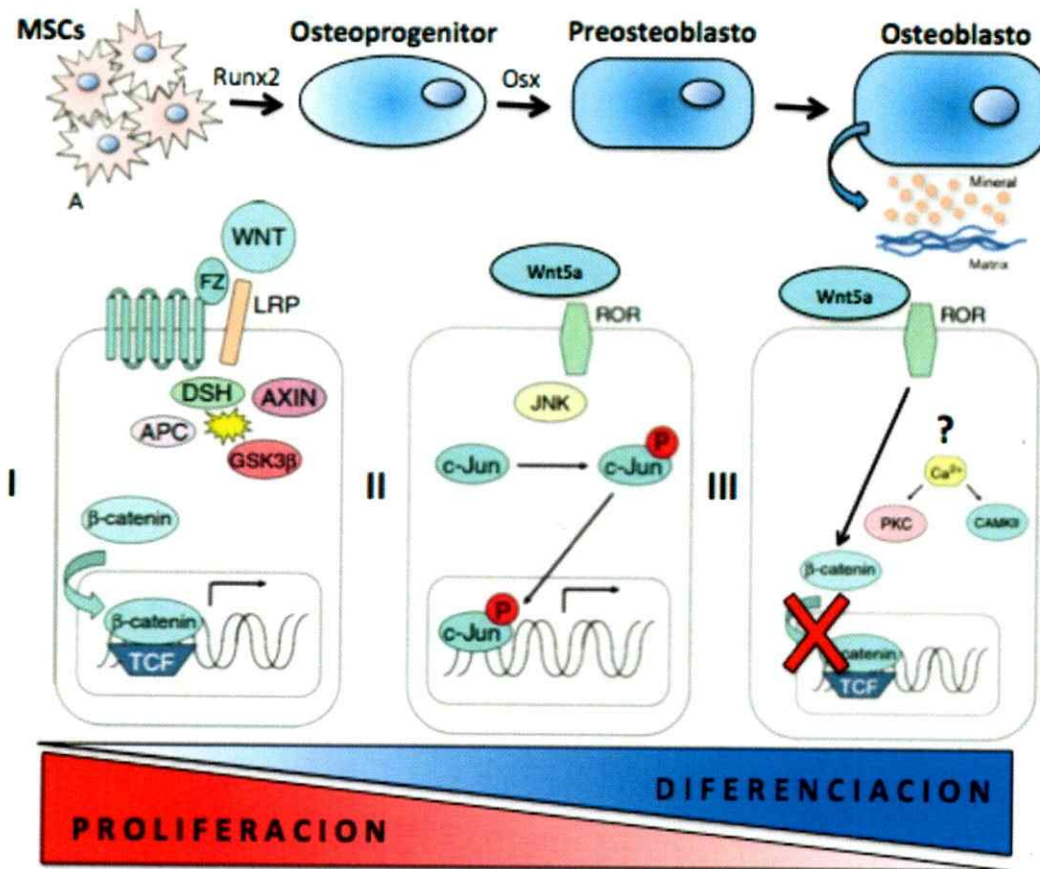


Figura 16. Modelo general diferenciación de MSCs a Osteoblastos

MSCs pierden la capacidad de proliferación a medida de que se diferencian a osteoblastos maduros capaces de generar una matriz mineralizada. I Células no diferenciadas presentan una vía Wnt canónica activa. II Wnt5a favorece la diferenciación mediante la unión al receptor Ror2 activando a JNK, y finalmente c-Jun favorece la expresión de genes como Osx y BSP. III Wnt5a también sería capaz de inhibir la activación de β -catenina aparentemente a través de PKC o CAMKII.

VIII. CONCLUSIONES

La proteína Wnt5a favorece la diferenciación de hMSCs a osteoblastos ya que aumenta la expresión de genes osteogénicos como *osx* y *bsp* y la posterior mineralización de la matriz extracelular.

El efecto de Wnt5a sobre la diferenciación osteogénica de hMSCs puede ser a través de la vía Wnt no canónica dependiente de JNK. Sin embargo, el efecto no sería exclusivamente a través de esta vía, sino que también podrían estar involucradas otras vías de señalización como la vía Wnt no canónica dependiente de calcio. Esta última en presencia del ligando, podría eventualmente estar involucrada en la inhibición de la señalización de β -catenina y además en la expresión de Ror2.

Procesos tan complejos, como es el caso de la diferenciación osteogénica de hMSCs, son gatillados por un conjunto de vías de señalización y, dependiendo del contexto celular, de factores solubles o de receptores, una vía de diferenciación podría estar mas activa que otra.

Sería interesante a futuro estudiar la relevancia de la señalización de vías Wnt no canónicas y el efecto de éstas sobre enfermedades óseas como la osteoporosis.

IX. BIBLIOGRAFIA

Afzal, A.R., and Jeffery, S. (2003). One gene, two phenotypes: ROR2 mutations in autosomal recessive Robinow syndrome and autosomal dominant brachydactyly type B. *Human Mutation* 22, 1-11.

Angers, S., and Moon, R. (2009). Proximal events in Wnt signal transduction. *Nature reviews Molecular cell biology* 10, 468-477.

Baksh, D., Song, L., and Tuan, R.S. (2004). Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 8, 301-316.

Bennett, C.N., Longo, K.A., Wright, W.S., Suva, L.J., Lane, T.F., Hankenson, K.D., and MacDougald, O.A. (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.

Bilkovski, R., Schulte, D.M., Oberhauser, F., Gomolka, M., Udelhoven, M., Hettich, M.M., Roth, B., Heidenreich, A., Gutschow, C., Krone, W., *et al.* (2010). Role of WNT-5a in the determination of human mesenchymal stem cells into preadipocytes. *The Journal of biological chemistry* 285, 6170-6178.

Billiard, J., Way, D.S., Seestaller-Wehr, L.M., Moran, R.A., Mangine, A., and Bodine, P.V.N. (2005). The Orphan Receptor Tyrosine Kinase Ror2 Modulates Canonical Wnt Signaling in Osteoblastic Cells. *Molecular Endocrinology* 19, 90-101.

Bogoyevitch, M.A., and Kobe, B. (2006). Uses for JNK: the Many and Varied Substrates of the c-Jun N-Terminal Kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 1061-1095.

Celli, A.B., and Campbell, P.G. (2005). BMP-2 and Insulin-like Growth Factor-I Mediate Osterix (Osx) Expression in Human Mesenchymal Stem Cells via the MAPK and Protein Kinase D Signaling Pathways. *Journal of Biological Chemistry* 280, 31353-31359.

Chen, G., Deng, C., and Li, Y.P. (2012). TGF- β^2 and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *International journal of biological sciences* 8, 272-288.

De, A. (2011). Wnt/Ca²⁺ signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 43, 745-756.

Gass, M., and Dawson-Hughes, B. (2006). Preventing Osteoporosis-Related Fractures: An Overview. *The American Journal of Medicine* 119, S3-S11.

Gogakos, A., Cheung, M., Bassett, D., and Williams, G. (2009). Bone signaling pathways and treatment of osteoporosis. *Expert Review of Endocrinology and Metabolism* 4, 639-650.

Green, J.L., Kuntz, S.G., and Sternberg, P.W. (2008). Ror receptor tyrosine kinases: orphans no more. *Trends in Cell Biology* 18, 536-544.

Hartmann, C. (2006). A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis. *Trends in Cell Biology* 16, 151-158.

He, F., Xiong, W., Yu, X., Espinoza-Lewis, R., Liu, C., Gu, S., Nishita, M., Suzuki, K., Yamada, G., Minami, Y., *et al.* (2008). Wnt5a regulates directional cell migration and cell proliferation via Ror2-mediated noncanonical pathway in mammalian palate development. *Development* 135, 3871-3879.

Hughes, E., Dai, A., Tiffée, J.C., Li, H.H., Mundy, G.R., and Boyce, B.F. (1996). Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nature Med* 2, 1132-1136.

Ishitani, T., Kishida, S., Hyodo-Miura, J., Ueno, N., Yasuda, J., Waterman, M., Shibuya, H., Moon, R.T., Ninomiya-Tsuji, J., and Matsumoto, K. (2003). The TAK1-NLK Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade Functions in the Wnt-5a/Ca²⁺ Pathway To Antagonize Wnt/ β -Catenin Signaling. *Molecular and Cellular Biology* 23, 131-139.

Jaiswal, N., Haynesworth, S.E., Caplan, A.I., and Bruder, S.P. (1997). Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *Journal of Cellular Biochemistry* 64, 295-312.

Javed, A., Bae, J.-S., Afzal, F., Gutierrez, S., Pratap, J., Zaidi, S.K., Lou, Y., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Stein, G.S., *et al.* (2008). Structural Coupling of Smad and Runx2 for Execution of the BMP2 Osteogenic Signal. *Journal of Biological Chemistry* 283, 8412-8422.

Kikuchi, A., Yamamoto, H., Sato, A., and Matsumoto, S. (2012). Wnt5a: its signalling, functions and implication in diseases. *Acta Physiologica* 204, 17-33.

Kilian, K.A., Bugarija, B., Lahn, B.T., and Micksch, M. (2010). Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.

Kohn, A.D., and Moon, R.T. (2005). Wnt and calcium signaling: β -Catenin-independent pathways. *Cell Calcium* 38, 439-446.

Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R.T., Gao, Y.H., Inada, M., *et al.* (1997). Targeted Disruption of Cbfa1 Results in a Complete Lack of Bone Formation owing to Maturation Arrest of Osteoblasts. *Cell* 89, 755-764.

Krishnan, V., Bryant, H.U., and MacDougald, O.A. (2006). Regulation of bone mass by Wnt signaling. *The Journal of Clinical Investigation* 116, 1202-1209.

Lamour, V., Detry, C.d., Sanchez, C., Henrotin, Y., Castronovo, V., and Bellahcène, A. (2007). Runx2- and Histone Deacetylase 3-mediated Repression Is Relieved in Differentiating Human Osteoblast Cells to Allow High Bone Sialoprotein Expression. *Journal of Biological Chemistry* 282, 36240-36249.

Leppa, S., and Bohmann, D. (1999). Diverse functions of JNK signaling and c-Jun in stress response and apoptosis. *Oncogene* 18, 6158-6162.

Li, C., Xiao, J., Hormi, K., Borok, Z., and Minoo, P. (2002). Wnt5a Participates in Distal Lung Morphogenesis. *Developmental Biology* 248, 68-81.

Liang, H., Chen, Q., Coles, A.H., Anderson, S.J., Pihan, G., Bradley, A., Gerstein, R., Jurecic, R., and Jones, S.N. (2003). Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue. *Cancer cell* 4, 349-360.

Lin, M., Li, L., Liu, C., Liu, H., He, F., Yan, F., Zhang, Y., and Chen, Y. (2011). Wnt5a regulates growth, patterning, and odontoblast differentiation of developing mouse tooth. *Developmental Dynamics* 240, 432-440.

Liu, G., Vijayakumar, S., Grumolato, L., Arroyave, R., Qiao, H., Akiri, G., and Aaronson, S.A. (2009). Canonical Wnts function as potent regulators of osteogenesis by human mesenchymal stem cells. *The Journal of cell biology* 185, 67-75.

Liu, Y., Bhat, R.A., Seestaller-Wehr, L.M., Fukayama, S., Mangine, A., Moran, R.A., Komm, B.S., Bodine, P.V.N., and Billiard, J. (2007). The Orphan Receptor Tyrosine Kinase Ror2 Promotes Osteoblast Differentiation and Enhances ex Vivo Bone Formation. *Mol Endocrinol* 21, 376-387.

Liu, Y., Rubin, B., Bodine, P.V.N., and Billiard, J. (2008). Wnt5a induces homodimerization and activation of Ror2 receptor tyrosine kinase. *Journal of Cellular Biochemistry* 105, 497-502.

MacDonald, B.T., Tamai, K., and He, X. (2009). Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Developmental Cell* 17, 9-26.

McBeath, R., Pirone, D.M., Nelson, C.M., Bhadriraju, K., and Chen, C.S. (2004). Cell Shape, Cytoskeletal Tension, and RhoA Regulate Stem Cell Lineage Commitment. *Developmental Cell* 6, 483-495.

Mikels, A., Minami, Y., and Nusse, R. (2009). Ror2 Receptor Requires Tyrosine Kinase Activity to Mediate Wnt5A Signaling. *Journal of Biological Chemistry* 284, 30167-30176.

Mikels, A.J., and Nusse, R. (2006). Purified Wnt5a Protein Activates or Inhibits β -Catenin/TCF Signaling Depending on Receptor Context. *PLoS Biol* 4, e115.

Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R., and de Crombrughe, B. (2002). The Novel Zinc Finger-Containing Transcription Factor Osterix Is Required for Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Cell* 108, 17-29.

Nomachi, A., Nishita, M., Inaba, D., Enomoto, M., Hamasaki, M., and Minami, Y. (2008). Receptor Tyrosine Kinase Ror2 Mediates Wnt5a-induced Polarized Cell Migration by Activating c-Jun N-terminal Kinase via Actin-binding Protein Filamin A. *Journal of Biological Chemistry* 283, 27973-27981.

Oishi, I., Suzuki, H., Onishi, N., Takada, R., Kani, S., Ohkawara, B., Koshida, I., Suzuki, K., Yamada, G., Schwabe, G.C., *et al.* (2003). The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway. *Genes to Cells* 8, 645-654.

Orbay, H., Tobita, M., and Mizuno, H. (2012). Mesenchymal Stem Cells Isolated from Adipose and Other Tissues: Basic Biological Properties and Clinical Applications. *Stem Cells International* 2012, 9.

Peters, R., Wolf, M.J., van den Broek, M., Nuvolone, M., Dannenmann, S., Stieger, B., Rapold, R., Konrad, D., Rubin, A., Bertino, J.R., *et al.* (2010). Efficient Generation of Multipotent Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord Blood in Stroma-Free Liquid Culture. *PLoS ONE* 5, e15689.

Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* 284, 143-147.

Raisz, L. (2005). Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *The Journal of Clinical Investigation* 115, 3318-3325.

Robling, A., Castillo, A., and Turner, C. (2006). BIOMECHANICAL AND MOLECULAR REGULATION OF BONE REMODELING. *Annual Review of Biomedical Engineering* 8, 455-498.

Rodan, G. (1998). Bone Homeostasis. *Proc Natl Acad Sci* 95, 13361-13362.

Schambony, A., and Wedlich, D. (2007). Wnt-5A/Ror2 Regulate Expression of XPAPC through an Alternative Noncanonical Signaling Pathway. *Developmental Cell* 12, 779-792.

Shapiro, F. (2008). Bone Development And Its Relation To Fracture Repair. The Role Of Mesenchymal Osteoblasts And Surface Osteoblasts. *European Cells and Materials* 15, 53-76.

Topol, L., Jiang, X., Choi, H., Garrett-Beal, L., Carolan, P.J., and Yang, Y. (2003). Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent {beta}-catenin degradation. *J Cell Biol* 162, 899-908.

Yamaguchi, A., Komori, T., and Suda, T. (2000). Regulation of Osteoblast Differentiation Mediated by Bone Morphogenetic Proteins, Hedgehogs, and Cbfa1. *Endocrine Reviews* 21, 393-411.

Yamaguchi, T.P., Bradley, A., McMahon, A.P., and Jones, S. (1999). A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo. *Development* 126, 1211-1223.

Yamanaka, H., Moriguchi, T., Masuyama, N., Kusakabe, M., Hanafusa, H., Takada, R., Takada, S., and Nishida, E. (2002). JNK functions in the non-canonical Wnt pathway to regulate convergent extension movements in vertebrates. *EMBO reports* 3, 69-75.

Yuan, Y., Niu, C.C., Deng, G., Li, Z.Q., Pan, J., Zhao, C., Yang, Z.L., and Si, W.K. (2011). The Wnt5a/Ror2 noncanonical signaling pathway inhibits canonical Wnt signaling in K562 cells. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE* 27, 63-69.

Zoumpourlis, V.C., and Vlahopoulos, S. (2004). JNK: A Key Modulator of Intracellular Signaling. . Biochemistry (Moscow) 69, 844-854.

Citas de Internet:

- Osteocord, Bone from blood.

<http://www.york.ac.uk/res/bonefromblood/background/boneremodelling.html>