



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE ODONTOLOGIA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS  
ÁREA DE BIOLOGÍA  
**LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

## **“FUNCIÓN DEL ATP EXTRACELULAR EN LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS RAW 264.7 A OSTEOCLASTOS MADUROS”**

*Fernán Gómez Valenzuela*

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN  
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

Prof. Sonja Buvinic Radic, PhD

**TUTOR ASOCIADO**

Prof. Paola Llanos Vidal, PhD

**ASESOR**

Julián Balanta Melo, DDS, MSc

**Adscrito a Fondecyt 1151353**

Santiago-Chile

Abril 2017

## **AGRADECIMIENTOS.**

Absolutamente agradecido de quienes fueron principales gestores de lo que significó haber llegado hasta aquí.

Agradecido de la guía, contención y confianza que siempre aportó la Dra. Sonja Buvinic en un proceso que parecía ser bastante ajeno y complejo de sacar adelante, como lo es la generación de conocimiento en las ciencias básicas.

Así como también de todos los miembros del Laboratorio de Biología Celular y Molecular. Al increíble equipo de trabajo que fuimos creando; la Dra. Paola Llanos, Manu, Caro, Julián, Camilo, Naty y por cierto, Nadia, quien fue fundamental en mi crecimiento académico estos últimos años. Muchas gracias por su alegría, disposición y orientación en todos los momentos en que se requería.

De mi familia: Bisabuelos y bisabuelas, abuelos y abuelas, tíos y tías, primas. Mis padres y mi hermana, quienes son y serán por siempre el pilar determinante de mi vida y orgullo de mi existencia. Sin lugar a dudas, cada vez que alguien de nosotros triunfa, por más nimio que parezca ese momento en la cotidianidad, es el resultado del esfuerzo y sacrificio de todos. Gracias por enseñarme que la educación es la herramienta más poderosa e impetuosa que tenemos y que con ella somos capaces de ser mejores, más humanos y felices.

A mis amigos, los cabros, quienes entregan su amistad de manera incondicional. Gracias por compartir nuestras vidas en estos ya tres lustres de experiencias y fraternidad; nos queda toda una vida por delante para seguir cultivando y cosechando nuestros triunfos juntos, como si la existencia de apellidos distintos fuera algo anecdótico entre hermanos.

Gracias a todos quienes me acompañaron con su amistad a lo largo de la Universidad, tanto en Bachillerato como en Odonto. Quienes lograban compartir sonrisas, cariños y felicidad en circunstancias que a veces parecían ser más desalentadores que alegres. A los “Gunus”, cruciales en los momentos más álgidos de la carrera, pues de la manera más loable posible pudimos apoyarnos y confiar entre nosotros para salir adelante.

*Gracias a cada uno de ustedes, los quiero mucho y por siempre.*

*"Todo esfuerzo que no es sostenido se pierde".*

Gabriela Mistral.-

## ÍNDICE DE CONTENIDOS.

RESUMEN.....	6
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA. ....	8
MARCO TEÓRICO .....	10
FISIOLOGÍA INTEGRADA EN EL SISTEMA MUSCULOESQUELÉTICO .....	10
SEÑALIZACIÓN POR NUCLEÓTIDOS EXTRACELULARES EN EL SISTEMA MUSCULOESQUELÉTICO.....	11
DESCRIPCIÓN GENERAL DEL TEJIDO ÓSEO .....	13
REMODELACIÓN ÓSEA .....	17
ATP EXTRACELULAR Y REMODELACIÓN ÓSEA.....	21
FISIOPATOLOGÍA DEL SISTEMA MASTICATORIO .....	22
SEÑALIZACIÓN POR NUCLEÓTIDOS EXTRACELULARES EN SISTEMA MASTICATORIO.....	24
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	25
HIPÓTESIS.....	26
OBJETIVO GENERAL.....	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
METODOLOGÍA .....	27
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....	27
MÉTODOS .....	28
PRESENTACIÓN DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	34
RESULTADOS.....	35
DISCUSIÓN .....	48
CONCLUSIONES .....	56
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
ANEXOS .....	67

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

Fig. 1. Estructura microscópica del tejido óseo .....	15
Fig. 2. Modelo de la diferenciación de células óseas .....	16
Fig. 3. Modelo de la diferenciación y activación de osteoclastos.....	18
Fig. 4. Diferencia entre la remodelación de hueso trabecular y cortical.....	21
Tabla 1. Partidores utilizados en la técnica de qPCR para amplificar ADNc derivados de ARNm para receptores de ATP o marcadores de osteoclastogénesis .....	31
Fig. 5. Curvas de Melting de ARNm utilizados como marcadores de diferenciación osteoclástica.....	33
Tabla 2. Presencia/Ausencia de expresión de distintos ARNm en células RAW 264.7 en estado monocítico y osteoclástico (posterior a la estimulación con RANKL por 5 días). .....	35
Fig. 6. Expresión de marcadores de osteoclastogénesis en células RAW 264.7 posterior a estímulo con RANKL por 5 días .....	36
Fig. 7. Expresión de receptores purinérgicos P2X en células RAW 264.7 posterior a estímulo con RANKL por 5 días. ....	37
Fig. 8. Expresión de receptores purinérgicos P2Y en células RAW 264.7 posterior a estímulo con RANKL por 5 días. ....	38
Fig. 9. Expresión de marcadores de diferenciación de osteoclastos posterior a estímulo con RANKL por 1 a 7 días .....	40
Fig. 10. Expresión de Anhidrasa Carbónica en células RAW 264.7 posterior a estímulo de ATP en distintos días .....	42
Fig. 11. Expresión de ATPasa en células RAW 264.7 posterior a estímulo de ATP en distintos días. ....	43
Fig. 12. Expresión de CTK en células RAW 264.7 posterior a estímulo de ATP en distintos días.....	44
Fig. 13. Expresión de MMP-9 en células RAW 264.7 posterior a estímulo de ATP en distintos días.....	45
Fig. 14. Expresión de TRAP en células RAW 264.7 posterior a estímulo de ATP en distintos días .....	46

## I. RESUMEN.

La comunicación entre los tejidos del sistema musculoesquelético históricamente se ha considerado en base a estímulos mecánicos. Sin embargo, hace una década ha surgido la idea de una comunicación bioquímica entre estos tejidos, vía moléculas secretadas. En nuestro grupo postulamos que el ATP extracelular sería una molécula de comunicación cruzada entre músculos y huesos. Para estudiar tal idea es necesario inicialmente reconocer el rol del ATP tanto en músculos como en huesos, y en cada uno de los tipos celulares que lo conforman. En el presente trabajo se estudió específicamente el rol del ATP extracelular en la diferenciación de monocitos a osteoclastos, células encargadas de la resorción durante la remodelación ósea. En la línea celular de monocitos de ratón RAW264.7 se evaluó la expresión de los ARNm para los distintos subtipos de receptores de ATP P2Y (1-2-4-6-12-13-14) y P2X (1-7). Además, se caracterizó la expresión de marcadores de osteoclastogénesis en estas células expuestas a un estímulo clásico de diferenciación (RANKL), o sometidas exclusivamente a ATP exógeno, a diferentes concentraciones (0,01-100  $\mu$ M) y por distintos tiempos (1-7 días).

Los resultados demostraron la expresión de receptores P2Y<sub>2-6-12</sub> y P2X<sub>3-4-7</sub> en estado de monocitos y osteoclastos. Por otro lado, al momento de analizar la acción del ATP en células RAW 264.7 en función a distintas concentraciones y días de estudio, se observó un aumento de la expresión de marcadores de osteoclastogénesis en los experimentos independientes, lo que respaldaría la relevancia de esta molécula como factor de diferenciación de osteoclastos y su participación en la remodelación ósea y comunicación músculo-hueso. Sin embargo, debido a la alta dispersión de datos, no se logró significancia estadística, fundamental para sacar conclusiones válidas. Por lo tanto, se sugiere el aumento del tamaño muestral para resolver este punto.

Reconocer el rol del ATP en la remodelación ósea y la comunicación músculo-hueso permitirá desarrollar opciones terapéuticas farmacológicas y moleculares para

patologías del sistema musculoesquelético. Esto será un gran aporte al campo de la odontología, dado que actualmente los trastornos temporomandibulares y del sistema masticatorio en su conjunto tienen origen poco claro y complejo, siendo tratados exclusivamente en forma paliativa

## II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El sistema musculoesquelético, compuesto por hueso, músculo, tendón y cartílago, posee las funciones de sostén, protección y movimiento del cuerpo animal. Cuenta con una fisiología finamente regulada de tal manera que cualquier modificación a uno de sus componentes presenta repercusiones en el resto.

Hasta hace pocos años se creía que la comunicación entre estos componentes se debía exclusivamente a interacciones mecánicas (generación y recepción de fuerzas), pero en el último quinquenio ha surgido la idea de una comunicación vía moléculas secretadas (Takahashi y cols., 2016). Así, cada uno de estos tejidos liberaría moléculas que impactarían en la función de los tejidos circundantes afectando la fisiología del sistema musculoesquelético general. Por tanto, la principal incógnita que se debe aclarar actualmente es cuáles son las moléculas esenciales para generar esta comunicación cruzada entre los tejidos señalados. En nuestro laboratorio proponemos que un intermediario relevante en este proceso es el Adenosín trifosfato extracelular (ATPe), debido a las siguientes propiedades: 1. Es una molécula ancestral ampliamente conservada entre especies, 2. Es una molécula ubicua sintetizada por todas las células del organismo, que tiene 15 subtipos distintos de receptores distribuidos en todas las células hasta hoy analizadas, 3. Se libera al medio extracelular frente a distintos estímulos fisiopatológicos y posee una corta vida media, lo que permite clasificarlo como un buen y rápido comunicador autocrino y paracrino y, 4. Se ha descrito su función en regular la plasticidad muscular y la remodelación ósea. La pregunta general de nuestro laboratorio es: ¿Participa el ATP extracelular en la comunicación cruzada músculo-hueso en el aparato masticatorio?

Sin embargo, antes de buscar su rol como comunicador músculo-hueso, es relevante reconocer la actividad del ATP extracelular en los distintos elementos de este sistema.



Esta tesis se enfocará en caracterizar el efecto del ATP extracelular en células que resorben hueso: los osteoclastos. Lo anterior permite generar las siguientes preguntas ¿Existen receptores de ATP extracelular en estas células? ¿Participa el ATP extracelular en la diferenciación de monocitos para promover la diferenciación de osteoclastos maduros?

La línea general de investigación y este trabajo en particular tienen gran proyección bio-odontológica, pues en el sistema masticatorio existe una estrecha relación músculo-hueso, tanto anatómica como funcional, desconociéndose los eventos moleculares que podrían permitir seleccionar y direccionar terapéuticas necesarias para las distintas patologías presentes en este sistema.

### III. MARCO TEÓRICO.

#### FISIOLOGÍA INTEGRADA EN EL SISTEMA MUSCULOESQUELÉTICO.

La interacción entre músculos esqueléticos y huesos se ha considerado históricamente basada en factores mecánicos, donde el hueso proporciona un sitio de unión para los músculos y éstos le aplican carga al hueso. En los últimos años ha surgido la idea que, más allá del acoplamiento mecánico entre músculos y huesos, estos tejidos presentan una comunicación cruzada a través de moléculas secretadas (Takahashi y cols., 2016; Pedersen y Febbraio, 2008). Por tanto, se hace evidente en variados trabajos la presencia de un *crosstalk* (conversación cruzada) bioquímico en el sistema musculoesquelético. Un ejemplo de esta teoría bioquímica se representa a través de la generación de un proceso inflamatorio en el tejido muscular que tiene consecuencias en el periostio adyacente al músculo (Isaacson y Brotto, 2014).

Se ha descrito, además, que las fracturas se recuperan en menor tiempo y generando tejido óseo de mejor calidad cuando existe contacto entre éste y el tejido muscular, por lo que interponer entre ambos tejidos una barrera física va en desmedro de aquello (Harry y cols., 2008). Una serie de modelos, tanto *in vitro* como *in vivo*, intentan relacionar múltiples factores tróficos presentes en la remodelación ósea. Estos modelos se caracterizan por ser en base a huesos largos y músculo esquelético, además permiten analizarlos de manera práctica a un nivel tanto molecular como celular (Laurent y cols., 2015). En este sentido, se establece una relación directa entre la respuesta osteogénica frente a cargas y tensiones musculares aplicadas sobre el hueso, sugiriendo que con la edad disminuye esta sensibilidad ósea frente a cargas mecánicas (Saarto y cols., 2012). Por otro lado, se establece que una deficiencia de hormona de crecimiento (GH) y factor de crecimiento semejante a la insulina 1 (IGF-1), en ensayos *in*

*vivo* de ratas, también participa en la reducción de esta sensibilidad generando atrofia muscular y pérdida de hueso (Alzghoul y cols., 2004).

Complementariamente, es posible evidenciar esta estrecha relación a un nivel molecular al considerar que el periostio es fundamental en la comunicación paracrina entre hueso y músculo. Siendo la interleuquina 6 (IL-6) una clásica mioquina liberada desde las fibras musculares durante su actividad, sus niveles séricos pueden inducir la resorción ósea (altos niveles) y regular directamente la diferenciación osteoblástica (bajos niveles) (Bustamante y cols., 2014). Además, estudios en ratas sugieren que diferentes factores de crecimiento derivados del tejido muscular (mioquinas, IGF-1, factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2)) se localizan en la interface músculo-hueso y exhiben receptores en el tejido óseo (Laurent y cols., 2015). Se ha descrito ampliamente que tanto músculo como hueso se pueden considerar órganos endocrinos pues liberan moléculas que ejercen su acción a nivel sistémico en tejidos como hígado, páncreas y sistema cardiovascular (Shao y cols., 2015; Brotto y Johnson, 2014; Pedersen y Febbraio, 2008). Por lo tanto, con mayor razón podrán ellos estar afectando la fisiología de sus tejidos adyacentes en el sistema musculoesquelético.

## **SEÑALIZACIÓN POR NUCLEÓTIDOS EXTRACELULARES EN EL SISTEMA MUSCULOESQUELÉTICO.**

El ATP es considerado como una molécula esencial en procesos energéticos y metabólicos en el espacio intracelular. Sin embargo, en las últimas décadas se ha demostrado su rol relevante como comunicador autocrino y paracrino (Abbracchio y cols., 2006; North, 2002).

La comunicación en base a nucleótidos extracelulares participa en la señalización paracrina entre neuronas y células gliales, en la agregación plaquetaria (Magni y Ceruti, 2014; Fields y Burnstock, 2006), en el control del tono vascular (Buvinic y cols., 2009;

Buvinic y cols., 2002), en la función epitelial (Schwiebert y Zsembery, 2003), y en la neurotransmisión en vías del dolor (Burnstock, 2006), entre otros.

El ATP es liberado de las células de manera basal y su liberación aumenta frente a estímulos tales como roce, inflamación o hipoxia. Los mecanismos de liberación descritos hasta la fecha son independientes de la lisis celular e incluyen la exocitosis mediada por vesículas o la liberación por vía conductora (a través de transportadores ABC, canales activados por voltaje, canales de conexinas o canales de panexina) (Cheung y cols., 2016; Lazarowski y cols., 2003; Gallagher, 2002).

Existen dos familias de receptores de superficie celular para nucleótidos extracelulares: P2X y P2Y. Los receptores P2X corresponden a canales iónicos activados por ATPe, que inducen corrientes de entrada no-selectivas de sodio y calcio. Los receptores P2Y son acoplados a proteína G activados por ATPe, ADP extracelular (ADPe), UTP extracelular (UTPe) o UDP extracelular (UDPe). Se han caracterizado farmacológica y molecularmente 7 subtipos de receptores P2X (P2X<sub>1-7</sub>) y 8 subtipos de receptores P2Y (P2Y<sub>1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14</sub>) en mamíferos (Lenertz y cols., 2015; Abbracchio y cols., 2006; North, 2002).

En músculo esquelético se ha reportado un importante rol de los nucleótidos extracelulares en la comunicación autocrina y paracrina (Valladares y cols., 2013), lo que permite trascender a la idea de los nucleótidos como actores exclusivamente intracelulares relacionados con el metabolismo e intercambio energético.

Los nucleótidos extracelulares regulan tanto la proliferación como la diferenciación de las células musculares esqueléticas. El ATP se libera desde las fibras musculares como consecuencia de la despolarización de su membrana, similar a lo que ocurre cuando el músculo es estimulado por su neurona motora (Chromiak y Antonio, 2008). En esas condiciones, el ATP es un intermediario relevante entre la despolarización de la membrana plasmática y la expresión de genes que promueven la plasticidad muscular. Por lo tanto, el ATP se libera desde los músculos activos y regula cómo dichos músculos cambiarán su fenotipo en respuesta al estímulo recibido.

Además, es sabido que el ATP es un neurotransmisor en las neuronas motoras, que se co-almacena y se co-libera con la acetilcolina durante el impulso nervioso (Silinsky, 1975). Esto significa que en la sinapsis neuromuscular existirá liberación de ATP tanto del componente pre sináptico como del músculo estimulado (Bustamante y cols., 2014; Casas y cols., 2014; Fernández-Verdejo y cols., 2014; Jorquera y cols., 2013; Buvinic y cols., 2009).

Considerando el rol del ATPe como una molécula de señalización autocrina/paracrina tanto en tejido óseo como muscular, junto con la relación evidente entre estos dos tejidos que conforman el aparato musculoesquelético, es posible caracterizar esta molécula como un mecanismo de comunicación cruzada entre estos tejidos, cuyo resultado final podría asociarse a cambios en la transcripción de genes.

## **DESCRIPCIÓN GENERAL DEL TEJIDO ÓSEO.**

El tejido óseo corresponde a una especialización del tejido conectivo, cuya característica principal es presentar una elevada mineralización de su matriz extracelular (MEC) confiriéndole una elevada rigidez y dureza para proteger los órganos vitales y estabilizar el sistema musculoesquelético. Además es importante en el metabolismo y homeostasis sérica pues contiene elevadas reservas de iones fosfato y calcio (Fitzgerald y cols., 2004). Corresponde a un tejido dinámico debido a la acción de una gran variedad de células y factores extrínsecos que permiten generar cambios en sus características tanto macroscópicas como microscópicas (Cediel y cols., 2009).

El tejido óseo visto desde un punto de vista *estructural* está compuesto por (Fig. 1):

- **Hueso cortical**

Formado por tejido óseo denso y laminar periférico, con grosor variable y una vasta cantidad de canalículos que albergan vasos sanguíneos y distintas células óseas (Voegeli y cols., 2004; Clarke, 2008).

- **Hueso esponjoso**

Corresponde a una red tridimensional compuesta por placas óseas sólidas y/o fenestradas, donde se ubica la médula ósea y los distintos tejidos hematopoyéticos óseos, rodeado por el hueso cortical existen de forma variable en las estructuras óseas (Voegeli y cols., 2004).

- **Periostio**

Corresponde a una túnica que envuelve el contorno externo del hueso cortical con dos capas de tejido conectivo fibroso, de manera que la más externa está conformada por tejido denso con predominio de colágeno tipo I y la capa interna está compuesta por células osteoprogenitoras (Cediel y cols., 2009).

- **Endostio**

Estructura membranosa de tejido conectivo delgado que cubre la superficie interna del hueso esponjoso y los distintos vasos sanguíneos presentes en el hueso, compuesto por una única capa de células osteoprogenitoras y células propias del hueso (Cediel y cols., 2009).



Fig. 1. Estructura microscópica del tejido óseo. Se evidencia la existencia de un trabeculado óseo y hueso laminillar. Nótese la capa interna (osteogénica) y externa (fibrosa) del periostio que recubre al tejido óseo. (*Buckwalter y cols., 1995*).

A nivel histológico, el tejido óseo está formado por una matriz MEC que rodea distintos tipos de células especializadas. Esta MEC se compone en un 70% de materia inorgánica (99% de sales fosfatos de calcio); 25% de materia orgánica (donde 90% es colágeno y el 10% restante son distintas proteínas estructurales no-colágenas como proteoglicanos, sialoproteínas y glicoproteínas); y un 5% de agua. Se han descrito, además, un gran número de factores de crecimiento y citoquinas presentes en la MEC (Kini y Nandeesh,

2012). Las células óseas cumplen roles determinantes en la mantención de la funcionalidad de la matriz descrita. Las células presentes en mayor proporción dentro del tejido óseo son (Fig. 2):

Osteobl  
cell

Osteocl



## I. Cé lula s de rev

### estimiento (“bone lining cells”)

Células alargadas derivadas de pre-osteoblastos latentes cuya diferenciación permite la generación de osteoclastos en hueso medular. Se encuentran ubicadas tanto en la superficie del tejido óseo, como en endostio y periostio (Cediel y cols., 2009; Andersen y cols., 2009; Voegeli y cols., 2004; Everts y cols., 2002).

## II. Osteoblastos

Células mono-nucleadas diferenciadas derivadas de células osteoprogenitoras ubicadas en el periostio y endostio cuya función principal es la síntesis y organización de los componentes orgánicos e inorgánicos de la matriz ósea (Kini y Nandeesh, 2012; Cediel y cols., 2009; Fitzgerald y cols., 2004; Voegeli y cols., 2004).



### III. Osteocitos

Células maduras propias del tejido óseo capaces de sintetizar y resorber limitadamente componentes de la matriz ósea. Cada una de estas células deriva de un osteoblasto que ha quedado dentro de una “laguna” de calcificación de matriz alrededor de ellas, por lo que corresponden alrededor de 90-95% del total celular óseo. Presentan largas prolongaciones comunicadas entre sí o en contacto con células inmersas en la periferia del tejido óseo, formando una red de canaliculos. Sus principales funciones corresponden a la transducción de estímulos mecánicos para generar diversos flujos de calcio y la modulación de la calcemia (Florencio-Silva y cols., 2015; Cediél y cols., 2009; Clarke, 2008; Fitzgerald y cols., 2004).

### IV. Osteoclastos

Células gigantes multinucleadas cuya función principal es la resorción ósea. Se originan a partir de la activación de células precursoras macrófagos/monocitos presentes en la circulación de la médula ósea -células troncales hematopoyéticas (HSCs)- que se fusionan, diferencian y activan. (Cediél y cols., 2009; Fitzgerald y cols., 2004; Voegeli y cols., 2004).

## REMODELACIÓN ÓSEA.

El tejido óseo posee una naturaleza dinámica al poder constantemente modelar (evento superficial donde existe nula coordinación entre osteoblastos, osteoclastos, osteocitos y *bone lining cell*) y remodelar (sincronismo entre estos cuatro tipos celulares) su estructura de manera fisiológica a medida que se presenten requerimientos físicos y biológicos (Cediél y cols., 2009; Datta y cols., 2008; Taylor y cols., 2007). Esta remodelación permite la mantención de las dimensiones de los huesos y la homeostasis de minerales propios de la matriz ósea (Voegeli y cols., 2004). Sin embargo existen otros tipos celulares, como linfocitos B, T y células neurales que también juegan un rol importante dentro de la remodelación ósea (Sims y Gooi, 2008).

A continuación se detallan los principales eventos de la remodelación ósea.

### A. Diferenciación osteoclástica

Tanto los osteoblastos funcionales como los osteocitos dañados por cargas mecánicas excesivas secretan factores quimio-atractivos que reclutan monocitos en la superficie del hueso que se desea remodelar (Rochefort y Benhamou, 2013). La diferenciación de los osteoclastos involucra la proliferación de las HSCs, su conversión a macrófagos, el progreso a un estado de progenitor de osteoclasto temprano (con expresión de receptor de calcitonina y fosfatasa ácida tartrato-resistente (TRAP)) y la fusión nuclear (Soysa y cols., 2012). (Fig. 3)

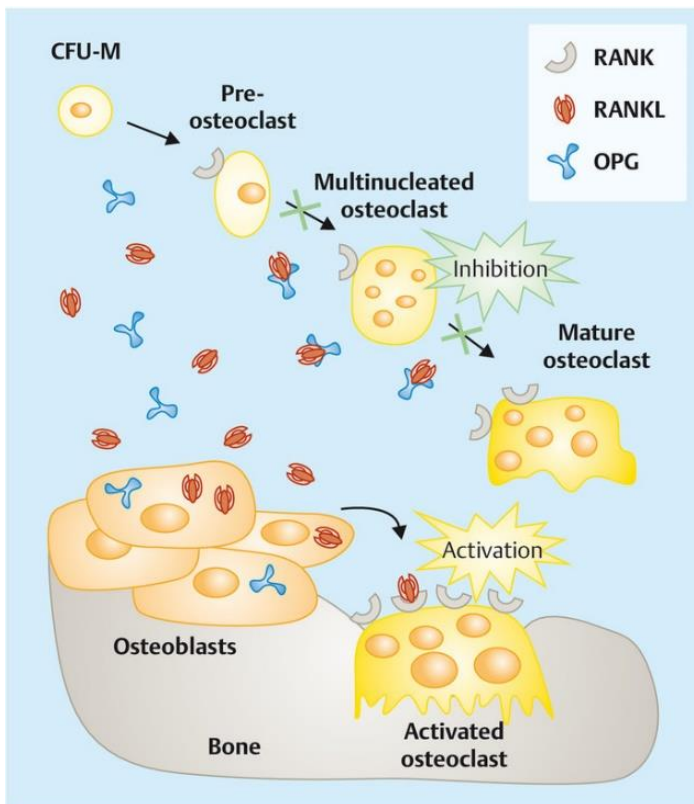


Fig. 3 Modelo de la diferenciación y activación de osteoclastos. Se observa la presencia del osteoclasto multinucleado (TRAP+) y su activación (generación de resorción ósea) (Juhász-Bösz y cols., 2012).

Se han descrito dos factores derivados del estroma de la médula ósea y de los osteoblastos esenciales en la diferenciación de los osteoclastos: Ligando de receptor activador para el factor nuclear κB (RANKL) y factor estimulante de colonia monocítica 1 (M-CSF1). Estos factores permiten la expresión de genes característicos en la

tipificación de linaje osteoclástico, como TRAP, catepsina K (CTK), metaloproteinasa 9 (MMP-9), receptor de calcitonina, Anhidrasa Carbónica e integrina- $\beta$ 3 (Soysa y cols., 2012).

Para la fusión de las células osteoprogenitoras, con el fin de formar una sola célula funcional multinucleada, es necesaria la presencia de familias de citoquinas como interleuquina 1  $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) y diferentes proteínas de membrana y de la MEC como integrinas y cadherinas (Soysa y cols., 2012; Sims y Gooi, 2008; Boyle y cols., 2003).

## **B. Activación osteoclástica**

La activación de los osteoclastos considera la polarización del osteoclasto diferenciado y la síntesis de proteínas que participarán en el proceso de resorción ósea, tales como Anhidrasa Carbónica, CTK y ATPasa lisosomal (Soysa y cols., 2012). Este proceso también es comandado principalmente por RANKL. Factor de crecimiento tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y distintos factores como la hormona paratiroidea (PTH), vitamina D<sub>3</sub>, prostaglandinas, prolactina y diferentes interleuquinas, estimulan la expresión de RANKL en la superficie del osteoblasto, cuya interacción con la molécula RANK presente en la membrana de los osteoclastos diferenciados permite su activación. Esta vía de activación osteoclástica es controlada negativamente por osteoprotegerina (OPG), secretada por los osteoblastos o por células osteogénicas del estroma. OPG actúa por interacción con RANKL, impidiendo su unión a RANK. (Fig. 2) Se ha demostrado que RANKL y M-CSF son necesarios para la diferenciación y la activación de los osteoclastos. Por tanto, OPG bloquea ambos procesos (Sims y Gooi, 2008).

Se ha descrito que la presencia de “cracks” en el tejido óseo y/o cargas mecánicas de elevado impacto sobre el hueso son reconocidos por los osteocitos ubicados en sus lagunillas, los que mediante sus proyecciones dendríticas se comunican con osteoblastos para fomentar la resorción ósea. Además, se ha descrito que osteocitos son la principal fuente de RANKL requerido por osteoclastos (Xiong y cols., 2015). Esto

es fundamental considerando que, antes de sintetizar nuevo tejido óseo por parte de los osteoblastos, es necesario remover el tejido dañado (Crockett y cols., 2011; Sims y Gooi, 2008).

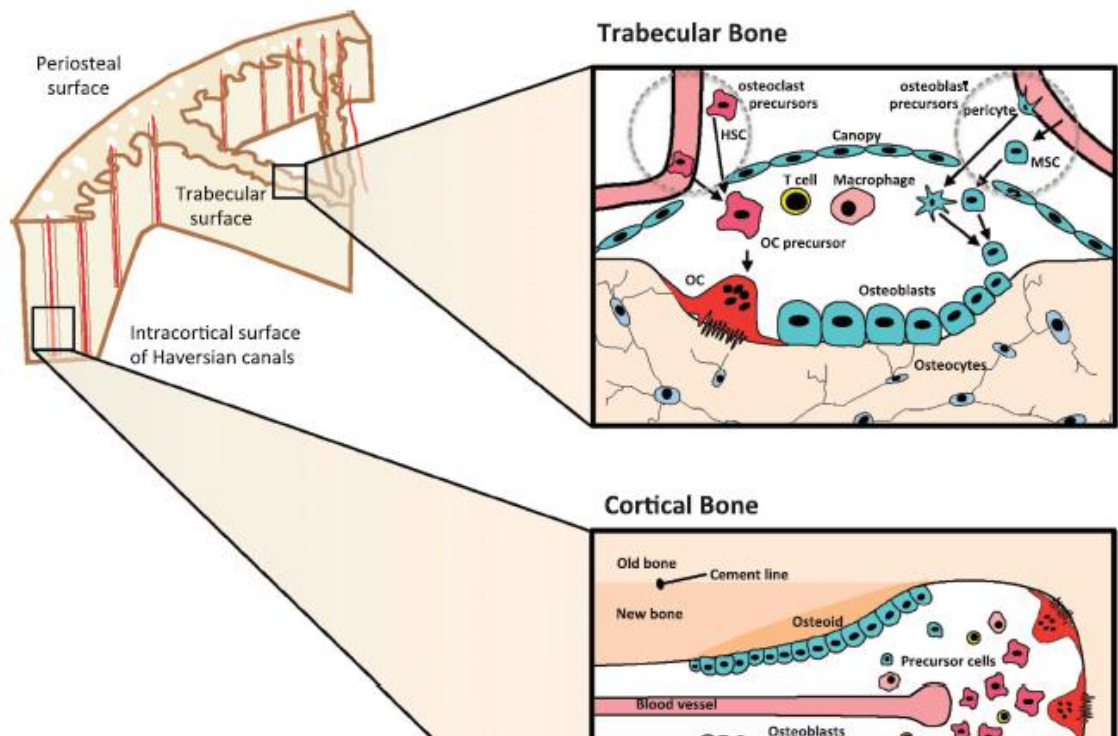
### **C. Aposición ósea**

Durante la remodelación ósea, la formación de hueso es controlada por factores locales y sistémicos (Kini y Nandeesh, 2012). Un claro ejemplo se ve en el sinergismo de factores sistémicos como la concentración de vitamina D<sub>3</sub> y prostaglandina E<sub>2</sub>, con IGF-1 cuya interacción permite la maduración de osteoblastos e intercomunicación con osteoclastos por medio de la expresión de RANKL y/o, mediante la presencia del factor de transcripción 2 relacionado con Runt (Runx2) y según los requerimientos fisiológicos presentes, diferenciarse en células “bone lining cells” o quedar inmersos en lagunillas de la matriz ósea como osteocitos (Crockett y cols., 2011).

Si bien la remodelación ósea corresponde a un proceso de alta sincronía celular del tejido óseo –lo que se denomina “unidad multicelular básica” (BMU)-, este proceso ocurre de manera asincrónica a través del tejido óseo (Eriksen, 2010; Matsuo, 2009). Se estima que la actividad de resorción de la BMU en un humano adulto lleva aproximadamente 3 semanas en completarse, en cambio la formación de hueso aproximadamente 3 a 4 meses (Sims y Martin, 2014), por lo que el reemplazo de todo el esqueleto humano tomaría alrededor de 10 años.

Esta actividad coordinada de la BMU difiere según el tipo de hueso que se esté remodelando. En hueso trabecular la BMU está localizada en la superficie y se necesita de un *canopy* formado por *bone lining cells* que generan un ambiente diferenciado mientras osteoclastos resorben hueso, mientras que paralelamente los osteoblastos cumplen con su formación secretora de matriz ósea. Por otro lado, en hueso cortical no existe la formación de un *canopy*, sino que osteoclastos y osteoblastos están en contacto directo con vasos sanguíneos provenientes de los canales de Havers (Fig. 4).

Fig. 4 Diferencia entre la remodelación de hueso trabecular y cortical. Se observa que para el hueso trabecular existe la generación de un *canopy* formado por bone lining cells que separan el medio de remodelación del torrente sanguíneo de la médula ósea, de donde surgen los precursores de osteoblastos y osteoclastos. Por otro lado, en hueso cortical existe contacto directo entre el sitio de remodelación con los vasos sanguíneos de los canales de Havers. (Sims y Martin., 2014).



## **ATP EXTRACELULAR Y REMODELACIÓN ÓSEA.**

Se ha demostrado la presencia de receptores P2Y/P2X en células relacionadas con la remodelación ósea (osteoblastos y osteocitos) (Burnstock y cols., 2013; Orriss y cols., 2010). La activación de estos receptores por ATPe generan la proliferación osteoblástica mediante señalización asociada a transitorios de calcio y, además, provocan la activación de Runx2 (factor de transcripción asociado a la diferenciación osteoblástica) en osteoblastos (Costessi y cols., 2005).

Por otro lado, también se ha demostrado la acción directa de nucleótidos extracelulares en receptores P2Y<sub>6</sub> de osteoclastos promoviendo su diferenciación y activación (Orriss y cols., 2011; Korcok y cols., 2005). Por otro lado, se ha propuesto que la acción del ATPe sobre receptores P2Y<sub>2</sub> en la membrana de osteoblastos genera una disminución de la mineralización de la matriz ósea.

Sin embargo, existen antecedentes diversos acerca de cuál es el resultado de la activación de estos receptores P2X y P2Y tanto en osteoblastos como en osteoclastos (Orriss y cols., 2010), donde incluso se ha descrito la inducción de apoptosis de estas células. Por tanto, es necesario generar un estudio detallado acerca de los efectos que genera el ATPe al activar sus receptores en base a distintas dosis y tiempos, pues no existen estudios que evidencien detalladamente la respuesta del ATPe en osteoclastos a distintas dosis y temporalidades o que diferencien su acción sobre el proceso de diferenciación y activación osteoclástica. Además, los pocos estudios que se han realizado para entender la relación de estos procesos han mostrado distintos resultados, por lo que sacar conclusiones es bastante complejo y, por tanto, es necesario un análisis riguroso y controlado sobre este tema de interés (Orriss y cols.; 2011; 2010).

## **FISIOPATOLOGÍA DEL SISTEMA MASTICATORIO.**

El Sistema Masticatorio es una unidad funcional caracterizada por la presencia de estructuras esqueléticas (mandíbula y maxilares), arcos dentales y tejidos blandos

(músculos masticatorios, ligamentos, glándulas salivales, vasos sanguíneos y nervios), junto con la presencia de las articulaciones temporomandibulares (ATM). Estas estructuras deben mantenerse en armonía estática y dinámica para cumplir con las exigencias funcionales básicas, a saber: hablar, comer, deglutir, etc. (Cuccia y Caradonna, 2009).

Los denominados trastornos temporomandibulares (TTM) corresponden a un grupo heterogéneo de patologías que afectan las estructuras músculo-esqueléticas que conllevan el desequilibrio tanto para las ATM, músculos masticatorios y todos los tejidos blandos asociados. (Durham y cols., 2015). Estos trastornos se han clasificado en dos ejes fundamentales, con el objetivo de estandarizar el diagnóstico y el manejo terapéutico para cada caso. Estos ejes son, según el criterio DC/TMD (*Diagnostic Criteria for Temporomandibular Disorders*) propuesto (Manfredini y cols., 2006; 2011):

- Eje I: Pacientes con diagnóstico físico.
- Eje II: Pacientes con diagnóstico psicosocial.

Sin embargo, esta clasificación se basa únicamente en los criterios clínicos e imagenológicos que existen para diagnosticar los TTM, sin existir estudios que aclaren cuáles son los eventos moleculares subyacentes a estas patologías que afectan al sistema masticatorio en su conjunto (Pupo y cols., 2016).

Por otro lado, al momento de realizar una revisión de cómo se entiende la comunicación de cada uno de los elementos del sistema masticatorio, como un elemento destacable del sistema músculo-esquelético, es apreciable que este sistema se estudia históricamente en base a las fuerzas mecánicas generadas entre cada una de las estructuras que lo componen. Por esto mismo, conocer las bases moleculares de esta interacción permitirá entender de mejor manera la etiopatogenia de los trastornos temporomandibulares y generar herramientas farmacológicas y terapéuticas concretas. Esto será un gran aporte al campo de la odontología, dado que actualmente los trastornos temporomandibulares y del sistema masticatorio en su conjunto tienen origen

poco claro y complejo siendo tratados exclusivamente en forma paliativa (Schiffman y cols., 2014).

### **SEÑALIZACIÓN POR NUCLEÓTIDOS EXTRACELULARES EN SISTEMA MASTICATORIO.**

Se ha descrito la presencia de receptores P2X y P2Y en distintas zonas de la región oral. En fibroblastos del tejido gingival se expresan receptores P2X<sub>7</sub> cuya activación aumenta los niveles de la citoquina inflamatoria interleuquina 8 (IL-8). En el tejido pulpar, el estrés mecánico provoca la liberación de UDP que activa receptores P2Y<sub>6</sub> y promueve la transcripción de IL-6. Se ha descrito también la liberación de ATP a través de hemicanales de conexina en ligamento periodontal, que actúa a nivel de receptores P2Y<sub>1</sub> regulando los niveles de osteopontina (OPN) y RANKL (Lim y Mitchell, 2012). Sin embargo, no existen estudios ni evidencias del rol del ATPe u otros nucleótidos extracelulares en el sistema masticatorio como mediadores de la remodelación ósea y plasticidad muscular. Por tanto, la línea general de nuestro laboratorio pretende determinar el posible rol del ATPe como mediador de la comunicación cruzada músculo-hueso en el aparato masticatorio. Y, por lo mismo, se debe desarrollar métodos experimentales que permitan esclarecer la base molecular de la comunicación entre estos dos tejidos, siendo el tejido óseo el elegido en esta investigación con el fin de entregar la evidencia con respecto a su posible plasticidad celular frente a la acción de nucleótidos extracelulares liberados por el tejido muscular.



#### **IV. PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.**

Como parte de la línea de investigación global que evalúa la plasticidad muscular y la remodelación ósea en el sistema masticatorio a través de nucleótidos extracelulares, es necesario precisar una serie de caracterizaciones previas. Es así que este proyecto evaluará concretamente el rol del ATPe en la diferenciación de osteoclastos en cultivo. Se utilizará la línea celular RAW 264.7 de monocitos de ratón, cuyos procesos de diferenciación y activación a osteoclastos maduros por RANKL han sido ampliamente caracterizados. En esta línea celular, se analizará la expresión de Ácido Ribonucleico Mensajero (ARNm) para los distintos subtipos de receptores de ATP (P2X y P2Y) y se caracterizará el efecto concentración- y tiempo-dependiente de ATPe respecto en la diferenciación a osteoclastos. Nuestro trabajo sentará las bases para que posteriormente en nuestro laboratorio se ensaye el efecto de medios condicionados derivados de músculos masticatorios de ratón en la osteoclastogénesis de esta línea celular, mediada por ATPe. Este proyecto, además de ser un engranaje relevante dentro de un proyecto mayor, aportará en sí mismo al conocimiento de la osteoclastogénesis inducida por nucleótidos extracelulares, con proyecciones en procesos de remodelación ósea en salud y enfermedad.

## **V. HIPÓTESIS.**

“El ATP extracelular promueve la diferenciación de monocitos RAW 264.7 a osteoclastos”.

## **VI. OBJETIVO GENERAL.**

Determinar si el ATP extracelular induce la diferenciación de células de la línea RAW 264.7 a osteoclastos.

## **VII. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

1. Determinar la expresión del ARNm para los distintos subtipos de receptores de nucleótidos extracelulares P2X/P2Y en células RAW 264.7 en estado de monocitos o luego de inducir su diferenciación a osteoclastos con RANKL.

2. Evaluar la diferenciación de células RAW 264.7 a osteoclastos en presencia de ATP extracelular (curvas concentración y tiempo-respuesta).

## VIII. METODOLOGÍA.

### 1. Estrategia Experimental.

**1.1** Determinar la expresión del ARNm para los distintos subtipos de receptores de nucleótidos extracelulares P2X/P2Y en células RAW 264.7 en estado de monocitos o luego de inducir su diferenciación a osteoclastos con RANKL.

Antes de evaluar el efecto de ATP exógeno en las células RAW 264.7, se buscó la posible expresión de los ARNm de distintos subtipos de receptores de ATP. Se evaluaron los niveles de ARNm y no de proteína, debido a su rápida detección y bajo costo por PCR tiempo real (qPCR), considerando el alto número de subtipos de receptores que se analizaron (7 P2Y y 7 P2X). Células RAW 264.7 se cultivaron por 5 días en ausencia o presencia de RANKL 35 ng/mL. En nuestro laboratorio está estandarizado que dicha concentración y tiempo de RANKL genera osteoclastos maduros. Se evaluaron los niveles de ARNm de receptores de nucleótidos de la familia P2Y (subtipos P2Y<sub>1-2-4-6-12-13 y 14</sub>) y P2X (subtipos P2X<sub>1-2-3-4-5-6 y 7</sub>) por qPCR. Además, se realizó la estandarización de funcionalidad de los partidores propuestos mediante su utilización en extracto total de cerebro de ratón.

**1.2** Evaluar la diferenciación de células RAW 264.7 a osteoclastos en presencia de ATP extracelular (curvas concentración y tiempo-respuesta).

Células RAW 264.7 serán cultivadas en presencia de distintas concentraciones de ATP extracelular (10 nM - 100 nM - 1  $\mu$ M - 10  $\mu$ M ó 100  $\mu$ M) por distintos tiempos (1- 3- 5- 7 días). Se evaluará la diferenciación de las células a cuantificación por qPCR del ARNm de marcadores de diferenciación (TRAP, MMP-9, catepsina K, ATPasa lisosomal y Anhidrasa Carbónica). Como control positivo se utilizarán células RAW 264.7 cultivadas en presencia de 35 ng/mL RANKL por 5 días, debido a la evidencia que especifica que a partir de esta cantidad de tiempo se encontraría un avanzado desarrollo de la diferenciación osteoclástica utilizando RANKL. Como control negativo se utilizarán células RAW 264.7 cultivadas en ausencia de estímulos adicionales al medio de cultivo.

## **2. Métodos.**

### **2.1 Cultivo celular.**

La línea celular de monocito-macrófago de ratón RAW 264.7 (ATCC®TIB-71™) se cultivó en Medio Dulbeccos's Eagle Modificado con alta glucosa, L-glutamina y rojo fenol (DMEM, Thermo Fisher, E.E.U.U.) suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB), penicilina 100 U/mL, estreptomina 100  $\mu$ g/mL y piruvato de sodio 1 mM, en un ambiente húmedo con 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Se realizaron pasajes de las células cada 2- 3 días, evitando que superen el 80% de confluencia. Se utilizaron células en pasajes 7- 15.

### **2.2 Diseño experimental y tratamientos farmacológicos.**

Se sembraron 3000 células RAW 264.7 por pocillo en placas de 24 pocillos.

Las células fueron sometidas a distintas concentraciones de ATP exógeno (10 nM – 100 nM – 1  $\mu$ M – 10  $\mu$ M ó 100  $\mu$ M) por distintos tiempos (1- 3- 5- 7 días). Para experimentos que duren más de 1 día, se cambió diariamente el medio de cultivo con el estímulo, considerando la degradación que sufre el ATP en el medio extracelular. Como control

positivo de diferenciación de las células, se utilizó RANKL soluble 35 ng/mL (PeproTech, NJ, E.E.U.U), a los mismos tiempos ensayados para el ATP.

Por lo tanto, los grupos de ensayo fueron los siguientes:

1 día: Sin estímulo / Con ATP exógeno (10 nM – 100 nM – 1  $\mu$ M – 10  $\mu$ M ó 100  $\mu$ M) / con RANKL 35 ng/mL.

3 días: Sin estímulo / Con ATP exógeno (10 nM – 100 nM – 1  $\mu$ M – 10  $\mu$ M ó 100  $\mu$ M) / con RANKL 35ng/mL.

5 días: Sin estímulo / Con ATP exógeno (10 nM – 100 nM – 1  $\mu$ M – 10  $\mu$ M ó 100  $\mu$ M) / con RANKL 35ng/mL.

7 días: Sin estímulo / Con ATP exógeno (10 nM – 100 nM – 1  $\mu$ M – 10  $\mu$ M ó 100  $\mu$ M) / con RANKL 35ng/mL.

La utilización de las concentraciones de ATP propuestas se debe a que no existen indicios acerca de cuál sería la concentración óptima para la activación de genes de diferenciación de osteoclastos. Además se ha demostrado la expresión máxima de estos genes posterior a la estimulación con RANKL por 5 a 7 días (Merrild y cols., 2015). Por tanto se hace necesario el estudio de temporalidad de la diferenciación de osteoclastos a partir de estímulos con ATP que se relacionen con lo aportado en las investigaciones de RANKL.

En resumen, un total de 3000 células RAW 264.7 se cultivaron por 1, 3, 5 y 7 días en presencia de distintas concentraciones de ATP (10 nM, 100 nM, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M ó 100  $\mu$ M) con un control positivo de RANKL 35 ng/mL. El medio fue sustituido diariamente con excepción del control positivo, ya que éste fue cambiado cada 3 días de acuerdo a lo recomendado en protocolos de diferenciación de células RAW 264.7. Al finalizar los tiempos de incubación, las células se procesaron de acuerdo a lo descrito a continuación en las distintas metodologías.

### **2.3 Extracción y cuantificación de ARN total.**

El ARN total de células RAW 264.7 con diferentes estímulos de ATP (10 nM, 100 nM, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M ó 100  $\mu$ M) por 1-7 días se extrajo usando reactivo Trizol® (Thermo Fisher, E.E.U.U.) de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante. Brevemente, las células fueron homogenizadas en 300  $\mu$ L de Trizol®, dejando la preparación a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, se adicionaron 67  $\mu$ L de cloroformo y se mezcló vigorosamente 10 veces por inversión, seguido de 20 seg. de vortex. Las mezclas fueron centrifugadas a 12000 g por 15 min a 4°C. La fase superior acuosa, que contiene el ARN de interés, fue removida y llevada a un tubo nuevo. El ARN se precipitó con 167  $\mu$ L de isopropanol y 3  $\mu$ L de Glycoblue (Thermo Fisher, E.E.U.U.) durante 2h a -20°C. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 12000 g por 10 min a 4°C. El precipitado se lavó con 1 mL de etanol 70% y se re-suspendió en 20  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas. Para evitar posible contaminación con Ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico, las muestras se trataron con un kit de DNAsa (Thermo Fisher, E.E.U.U.), según las indicaciones del fabricante. La concentración de ARN se determinó mediante espectrofotometría a 260 nm, en el equipo Synergy HT microplate reader (Biotek, E.E.U.U.). La pureza de la extracción se determinó mediante la relación de absorbancia 260/280 nm; sólo se utilizó el ARN si dicha razón estaba en el rango 1,8- 2,0. El ARN se almacenó a -80°C hasta su utilización.

### **2.4 RT- PCR tiempo real.**

Para la reacción de transcripción reversa se utilizó la enzima SuperScript II (Thermo Fisher, E.E.U.U.). Se incubó una mezcla de 1  $\mu$ g de ARN, 1  $\mu$ L de dNTP 10 mM y 1  $\mu$ L de poli dT 10 mM en un volumen final de 10  $\mu$ L (completando el volumen con H<sub>2</sub>O sin nucleasas) durante 5 minutos a 65°C y 1 min a 4°C. Posteriormente se agregó a cada tubo la siguiente mezcla: 4  $\mu$ L buffer de la enzima 5x, 2  $\mu$ L DTT 0,1 M, 0,5  $\mu$ L (100 U) de transcriptasa inversa SuperScript II, y 1,5  $\mu$ L de agua sin nucleasas. La síntesis de Ácido desoxirribonucleico cíclico (ADNc) se realizó incubando a 42°C por 50 min y la

reacción se detuvo a 72°C por 15 min. Luego de la obtención del ADNc se realizó el qPCR para determinar los niveles de ARNm de receptores P2Y (subtipos 1, 2, 4, 6, 12, 13 y 14), receptores P2X (subtipos 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7) o marcadores de osteoclastogénesis. Los partidores sentido y antisentido para cada mensajero a amplificar se detallan en la Tabla 1, junto a la concentración final de uso. La concentración óptima de cada partidior se encontraba previamente estandarizada en nuestro laboratorio como aquella que entrega 95-105% de eficiencia en la reacción. Para la reacción de PCR se utilizó 1 µL de ADNc, 6 µL Fast Sybr Green Master Mix (Thermo Fisher, E.E.U.U.) 1,2 µL de partidiores (sentido + antisentido, concentración dependió de la concentración final de uso para cada pareja de partidiores) y 3,8 µL de H<sub>2</sub>O sin nucleasas. Para el qPCR se utilizó el equipo StepOne® (Thermo Fisher, E.E.U.U.).

Se realizaron reacciones sin ADNc molde para corroborar la amplificación específica de la reacción de PCR, además de realizarse reacciones sin la enzima transcriptasa inversa para controlar que los productos de amplificación no correspondían a ADN genómico. El protocolo de amplificación utilizado fue el siguiente: 95°C por 20 seg. y luego 40 ciclos de 95°C por 3 seg. (desnaturación) y 60°C (hibridación/extensión) por 30 seg. Los valores fueron normalizados a la expresión de GADPH y reportados bajo el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . (Pfaffl, 2001). Para cada condición de cada partidior se obtuvo su valor de umbral de ciclos Ct (*cycle threshold*) que representa el número de ciclos necesarios para que cada partidior analizado alcance un umbral de señal de fluorescencia. La comparación de Ct entre las muestras permite reconocer la diferencia en el total inicial de moléculas de ADN o ADNc específico a evaluar, ya que mientras mayor cantidad de ADN blanco exista en la muestra, menor será el número de ciclos (Ct) que se requiere para alcanzar este umbral, pudiendo estimar la cantidad relativa de ARNm a partir de este valor. Por otro lado, el concepto de NTC (*Not Template Control*) corresponde al control blanco de la técnica (sin ADNc).

Tabla 1: Partidores utilizados en la técnica de qPCR para amplificar ADNc derivados de ARNm para receptores de ATP o marcadores de osteoclastogénesis.

ADNc a amplificar	Partidor Sentido	Partidor Antisentido	Concentración final nM
<b>P2X<sub>1</sub></b>	TGTACGGGGAGAAGAACCTG	TCCCAAACACCTTGAAGAGG	200
<b>P2X<sub>2</sub></b>	CGTCTTCATCGTGCAGAAAA	CACTTTGTGTTCCGACATGG	600
<b>P2X<sub>3</sub></b>	TACCAAGTCGGTGGTTGTGA	CCACCCACAAAGTAGGAGA	400
<b>P2X<sub>4</sub></b>	GCACCCTCCACCATCTCTAA	AAACCTCTTGCCAGAAGCAA	600
<b>P2X<sub>5</sub></b>	ACCAACCTGATCGTGACTION	CAGTCGGTGTCTCTGAACA	400
<b>P2X<sub>6</sub></b>	GTGGATAGAGAGGCCGGTTT	GTAACAGGGTTAGCGGGTGA	400
<b>P2X<sub>7</sub></b>	GGCACTGGAGGAAAATTTGA	TGAGCAAGTCAATGCACACA	600
<b>P2Y<sub>1</sub></b>	AGGAAAGCTTCCAGGAGGAG	CGTGTCTCCATTCTGCTTGA	400
<b>P2Y<sub>2</sub></b>	GTCAGCAGTGACGACTCAAGAC	TCAGAGGATATCAGCCCCTTTA	600
<b>P2Y<sub>4</sub></b>	AGGAAGCAGCAGAACACCAT	CAAGGAGTCTGCACTGGTCA	600
<b>P2Y<sub>6</sub></b>	TTCCATCTTGCATGAGACAGAC	GCTTGAAATCCTCACGGTAGAC	600
<b>P2Y<sub>12</sub></b>	CCTGTGCGTCAGAGACTACAAG	GGATTTACTGCGGATCTGAAAG	600
<b>P2Y<sub>13</sub></b>	GGCCACTAGATGTCACCTTTTC	GATGGTGGGGTGGTAACTAGAA	600
<b>P2Y<sub>14</sub></b>	GGAATTCTCTCTTCCGAATCCT	TGTTCATCTTCTCACCTCTGGA	600
<b>TRAP</b>	CGACCATTGTTAGCCACATACG	TCGTCTGAAGATACTGCAGGTT	600
<b>MMP-9</b>	GCTGACTACGATAAGGACGGCA	GCGGCCCTCAAAGATGAACGG	600
<b>Catepsina K</b>	ATATGTGGGCCAGGATGAAAGTT	TCGTTCCCCACAGGAATCTCT	600
<b>ATPasa lisosomal</b>	ACGGTGATGTCACAGCAGACGT	CCTCTGGATAGAGCCTGCCGCA	600

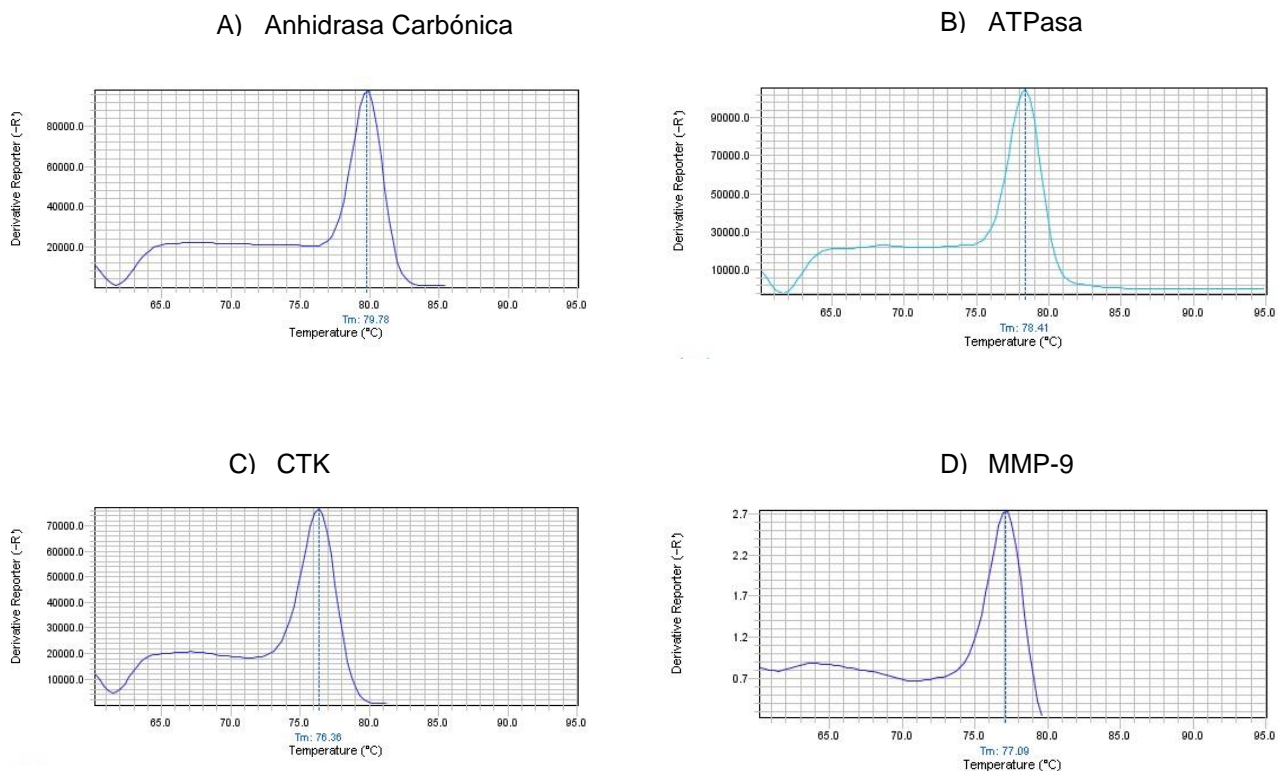


<b>Anhidrasa Carbónica</b>	CTCTGCTGGAATGTGTGSCCTG	CTGAGCTGGACGCCAGTTGTC	400
<b>GAPDH</b>	CAACTTGGCATTGTGGAAG	CTGCTTACCACCTTCTTG	400

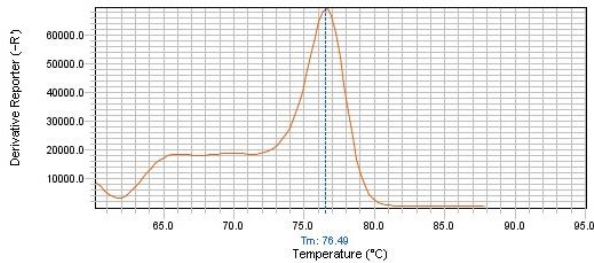
Se detallan los partidores sentido y antisentido para cada ADNc a amplificar, además de su concentración final de uso en la reacción de qPCR.

A continuación se muestran las Curvas de Melting para cada partidior utilizado:

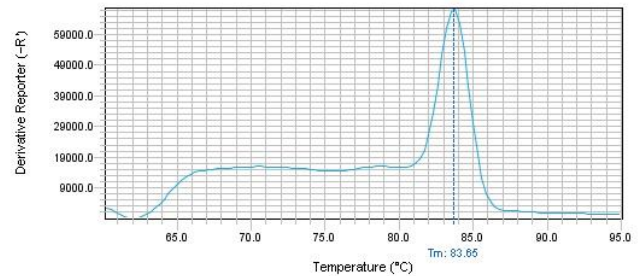
Fig. 5. Curvas de Melting de ARNm utilizados como marcadores de diferenciación osteoclástica



E) TRAP



F) GAPDH



Curvas de Melting de muestras representativas para cada partidior utilizado.

### 3. Presentación de datos y análisis estadístico.

Cada uno de los ensayos se realizó de manera independiente al menos 3 veces (en células provenientes de distintos cultivos). Los resultados fueron presentados como Promedio  $\pm$  Error Estándar del número de experimentos independientes indicados (n) o como ejemplo representativo de experimentos realizados al menos tres veces de forma independiente, lo que permitió descartar datos que tuvieron variabilidad de más de 500 veces con respecto al resto en cada una de las condiciones propuestas. Las comparaciones entre los grupos se realizaron mediante el test no pareado y no paramétrico de Mann-Whitney cuando existió una única condición contra un control. Para comparaciones múltiples, se utilizó ANOVA de dos vías seguido de la prueba post-hoc de Bonferroni de comparaciones múltiples. Un valor  $p < 0,05$  fue considerado como límite de significancia.

## **IX. RESULTADOS.**

1. Expresión de ARNm para receptores P2X/P2Y en células RAW 264.7 en estado de monocito u osteoclasto.

Células RAW 264.7 se cultivaron por 5 días en ausencia o presencia de RANKL 35 ng/mL. Se evaluaron los niveles de ARNm de receptores de nucleótidos de la familia P2Y y P2X por qPCR. Como control positivo de la diferenciación a osteoclasto se utilizaron los marcadores: TRAP, CTK, MMP-9, ATPasa y Anhidrasa Carbónica.

Teniendo un n=3, se evaluaron los Ct correspondiente a cada partidor, teniendo un NTC para cada uno, considerándose presencia de expresión cuando existía una diferencia mayor a 5 Ct con respecto al NTC respectivo.

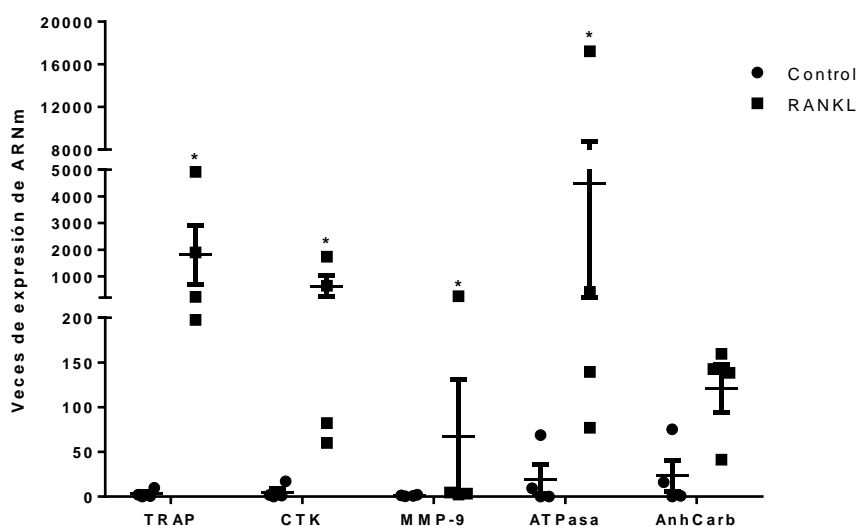
Tabla 2. Presencia/Ausencia de expresión de distintos ARNm en células RAW 264.7 en estado monocítico y osteoclasto (posterior a la estimulación con RANKL por 5 días).

Partidor	Presencia (+)/ Ausencia (-) de expresión	
	Monocito	Osteoclasto
TRAP	-	+
CTK	-	+
MMP-9	-	+
ATPasa lisosomal	-	+
Anhidrasa Carbónica	-	+
P2X <sub>1</sub>	-	-
P2X <sub>2</sub>	-	-
P2X <sub>3</sub>	-	+
P2X <sub>4</sub>	+	+
P2X <sub>5</sub>	-	-
P2X <sub>6</sub>	-	-
P2X <sub>7</sub>	+	+
P2Y <sub>1</sub>	-	-
P2Y <sub>2</sub>	+	+
P2Y <sub>4</sub>	-	-
P2Y <sub>6</sub>	+	+
P2Y <sub>12</sub>	+	+
P2Y <sub>13</sub>	-	-
P2Y <sub>14</sub>	-	-

Los resultados indican la presencia de los receptores subtipos P2X<sub>4</sub> y 7 y subtipos P2Y<sub>2</sub>, 6 y 12 en ambos estados de células RAW 264.7. Sin embargo, el receptor P2X<sub>3</sub> se expresó únicamente para dos cultivos celulares o “n” en el estado monocítico.

Según lo establecido, se presenta el control positivo como veces de expresión de los marcadores característicos de diferenciación osteoclástica en condición RANKL por 5 días (Fig.6).

**Fig. 6 Expresión de marcadores de osteoclastogénesis en células RAW 264.7 con RANKL**

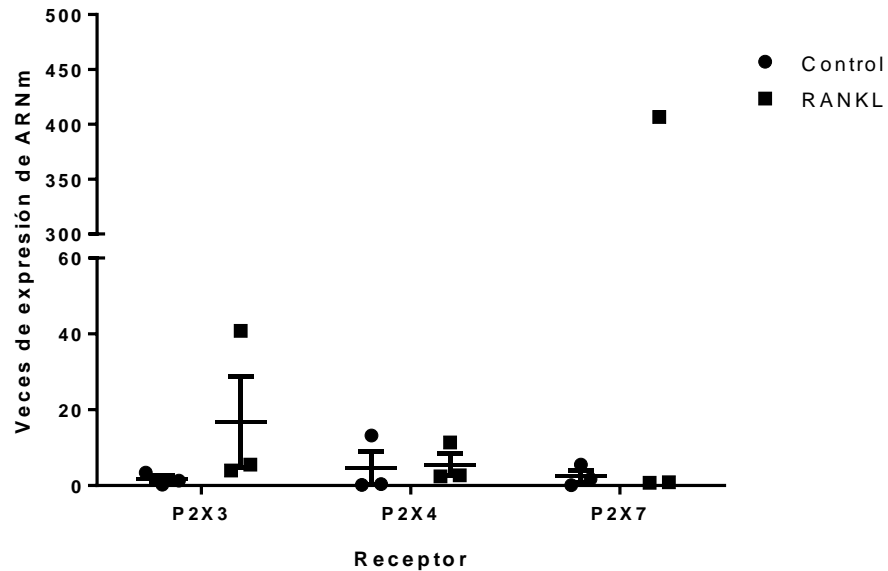


Detección a través de qPCR de ARNm de marcadores de diferenciación osteoclástica (TRAP, CTK, MMP-9, ATPasa y Anhidrasa Carbónica (AnhCarb) en células RAW 264.7 posterior a estímulo con RANKL 35 ng/mL por 5 días (n=4). Resultados normalizados respecto a GAPDH en la condición control (sin RANKL). Test no-pareado Mann Whitney. Los puntos muestran valores expresados como media  $\pm$  error estándar. \*:  $p < 0,05$ .

Previo al estudio de la expresión de receptores purinérgicos y para validar nuestro método de obtención de osteoclastos, se analizó la expresión de marcadores de diferenciación de osteoclasto. Estos resultados entregaron diferencias significativas luego de la estimulación con RANKL por 5 días para TRAP, CTK, MMP-9 y ATPasa (Fig. 6) existieron diferencias significativas con respecto a su control negativo. En contraste, para Anhidrasa Carbónica (AnhCarb) no existieron diferencias significativas ( $p=0,057$ ). Sin embargo al analizar cada uno de los experimentos de manera independiente, se observó aumentos individuales de la expresión para los cuatro experimentos realizados, por lo que se espera que ampliando el tamaño de la muestra se refleje esta diferencia significativa encontrada en los otros marcadores propuestos.

- i. Comparación de cantidad de veces de aumento de expresión de los receptores purinérgicos de familia **P2X** en condición RANKL vs medio sin estímulo (Control).

**Fig. 7 Expresión de receptores purinérgicos P2X en células RAW 264.7 posterior a estímulo con RANKL por 5 días**



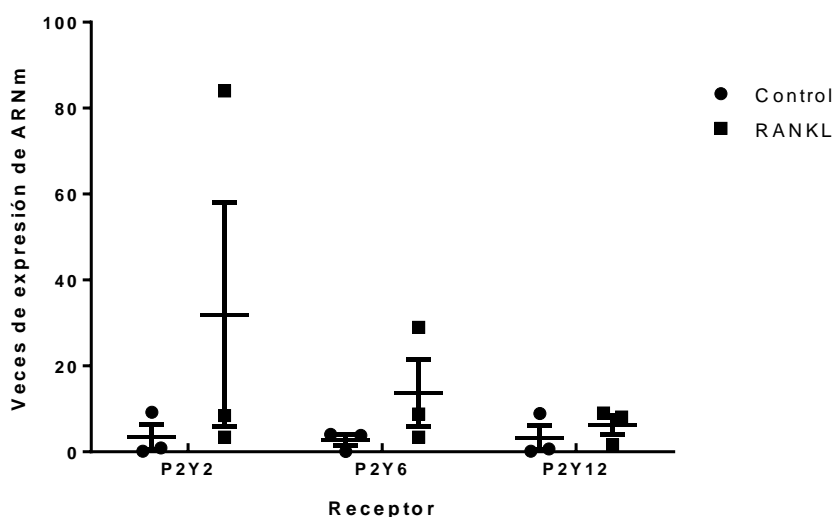
Detección a través de qPCR de ARNm de receptores purinérgicos de la familia P2X en células RAW 264.7 posterior a estímulo con RANKL por 5 días (n=3). Resultados normalizados respecto a GAPDH en la condición control (sin RANKL). Test no-pareado Mann Whitney. Los puntos muestran valores expresados como media  $\pm$  error estándar. No se encontró significancia para ninguna de las comparaciones.

El resultado del análisis estadístico no mostró diferencias significativas en la expresión de los receptores P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub> y P2X<sub>7</sub> posterior a la estimulación con RANKL (p=0,1; p=0,7 y p=0,9, respectivamente). A pesar de lo sucedido con el promedio, es posible evidenciar que al analizar los resultados de manera independiente del “n”=3, se evidenció un aumento de la expresión de 20 a 400 veces en dos de los tres experimentos realizados para los receptores P2X<sub>4</sub> y P2X<sub>7</sub>, en la condición RANKL. Además, para el receptor P2X<sub>3</sub> analizado a través de experimentos de manera independiente, se observó un aumento en su expresión en condición

RANKL en los tres experimentos realizados, existiendo un aumento entre 2 a 40 veces de expresión.

- ii. Comparación de cantidad de veces de aumento de expresión de los receptores purinérgicos de familia P2Y en condición RANKL vs medio control.

Fig. 8 Expresión de receptores purinérgicos P2Y en células RAW 264.7 posterior a estímulo con RANKL por 5 días



Detección a través de qPCR de ARNm de receptores purinérgicos de la familia P2Y en células RAW 264.7 posterior a estímulo con RANKL por 5 días. (n=3). Resultados normalizados respecto a GAPDH en la condición control (sin RANKL). Test no-pareado Mann Whitney. Los puntos muestran valores expresados como media  $\pm$  error estándar. No se encontraron diferencias significativas para ninguna de las comparaciones

Al momento de analizar de manera independiente cada uno de los experimentos del n=3, se observó una de aumento de expresión para los tres experimentos en receptores P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>12</sub> de 4 a 80 veces y de 2 a 50 veces, respectivamente. Por otro lado, en el receptor P2Y<sub>6</sub> se observó un aumento en dos de los tres experimentos realizados. Sin embargo, debido a la elevada dispersión de datos, el análisis estadístico no evidenció

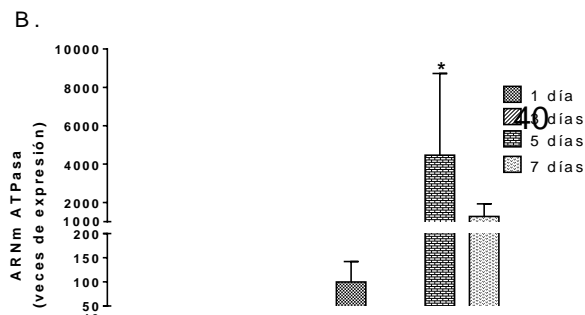
diferencias significativas en la expresión de receptores P2Y posterior al estímulo con RANKL ( $p=0,4$  para los tres receptores).

2. Evaluación del comportamiento temporal (día 1-7) de los marcadores de diferenciación de osteoclastos posterior al estímulo con RANKL.

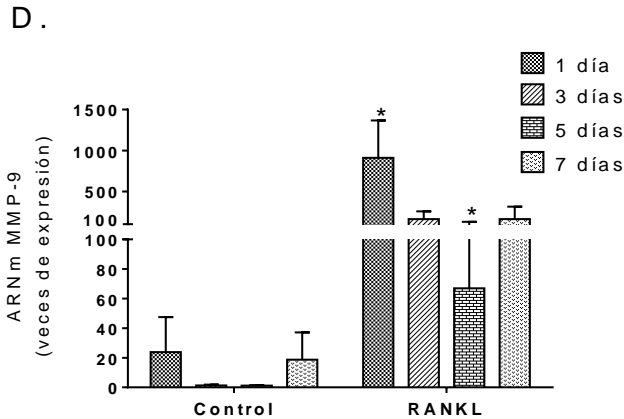
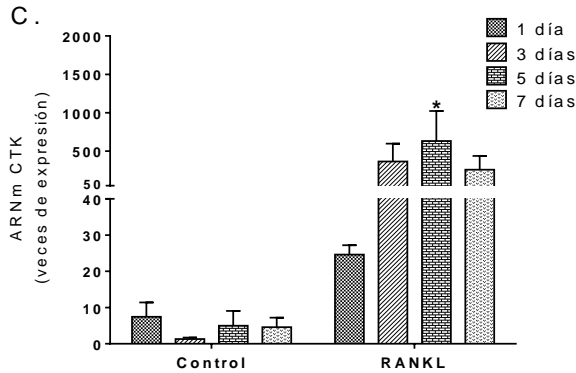
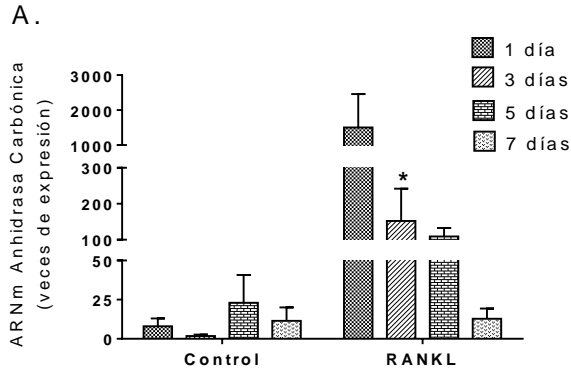
Considerando que la estimulación con RANKL por 5 días consiste en el control positivo propuesto para la osteoclastogénesis, resulta interesante realizar un análisis temporal de la expresión de los marcadores de diferenciación a osteoclastos desde el día 1 hasta el día 7 con RANKL. Este análisis permite evidenciar en qué momentos existe una mayor expresión de cada uno de los marcadores de diferenciación a osteoclastos estudiados. Además, estos resultados se pueden contrastar de manera sencilla con los obtenidos a partir de la estimulación con ATP en distintas concentraciones por diferentes días.

En la Fig. 9, se presentan los resultados de expresión para los marcadores de diferenciación de osteoclastos (Anhidrasa Carbónica, ATPasa, CTK, MMP-9 y TRAP) posterior al estímulo de RANKL 35 ng/mL por 1 a 7 días.

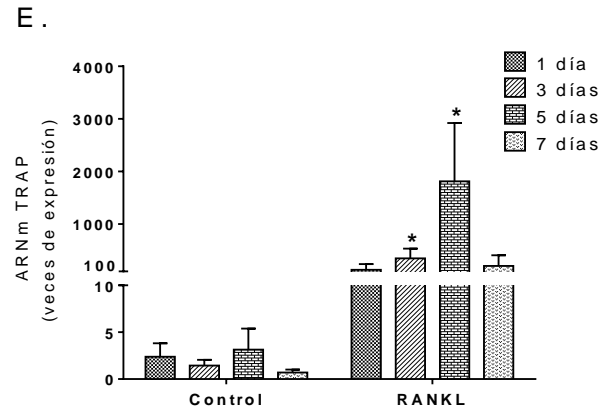
Fig. 9. Expresión de marcadores de diferenciación de osteoclastos posterior a estímulo con RANKL por 1 a 7 días.







Detección a través de qPCR de ARNm de Anhidrasa Carbónica (A), ATPasa (B), CTK (C), MMP-9 (D) y TRAP (E) en células RAW 264.7 posterior a estímulo con RANKL por 1, 3, 5 y 7 días (n=4). Resultados normalizados respecto a GAPDH en la condición control. Test ANOVA de dos vías y Bonferroni para comparaciones múltiples. Las barras muestran valores expresados como media  $\pm$  error estándar. \*:  $p < 0,05$ .



Luego del análisis estadístico se evidenció que para Anhidrasa Carbónica (Fig. 9-A) solamente se halló diferencias significativas al día 3 ( $p = 0,0286$ ). Por otro lado, para ATPasa, CTK, MMP-9 y TRAP (Fig. 9. B-E) existieron diferencias significativas de su expresión al día 5, luego de la estimulación con RANKL ( $p=0,0286$ , en todos los

casos). Además, para MMP-9 y TRAP también se encontraron diferencias significativas en el día 1 y el día 3, respectivamente ( $p=0,0286$ , en ambos casos).

Para el resto de los días de estudio no se hallaron diferencias significativas en los distintos marcadores propuestos. (1. Anhidrasa carbónica: 1, 5 y 7 días:  $p=0,0571$ ;  $p=0,0571$  y  $p=0,671$ , respectivamente; 2. ATPasa: 1, 3 y 7 días:  $p=0,0571$ ;  $p=0,6571$ ;  $p=0,0571$ , respectivamente; 3. CTK: 1, 3 y 7 días:  $p=0,0571$ ;  $p=0,0571$ ;  $p=0,4$ , respectivamente; 4. MMP-9: 3 y 7 días:  $p=0,0571$  y  $p=0,6286$ , respectivamente; 5. TRAP: 1 y 7 días:  $p=0,2$  en ambas condiciones).

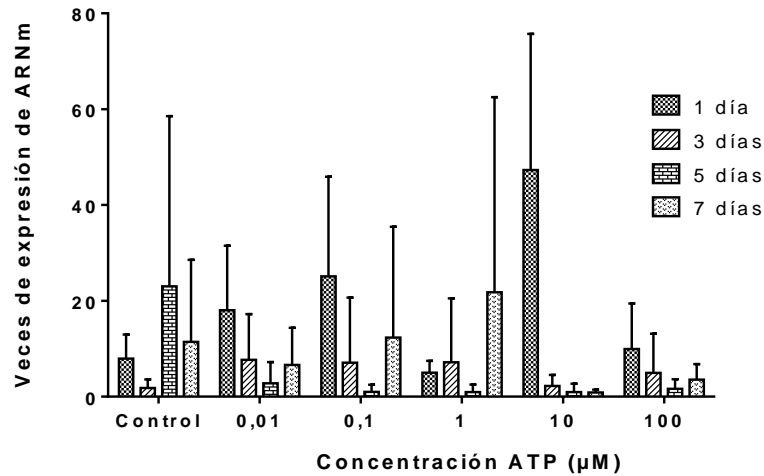
Finalmente, al analizar cada uno de los ensayos manera independiente (cada cultivo celular o "n" por separado), se evidenció que en todos los días de estudio existió un aumento de expresión de todos los marcadores analizados.

### 3. Evaluación de diferenciación de células RAW 264.7 en estado de monocitos a osteoclastos en presencia de ATP extracelular.

Se analizó la expresión de los distintos marcadores de osteoclastogénesis previamente descritos en respuesta a diferentes concentraciones de ATP (0,01-100  $\mu\text{M}$ ) y diferentes días (1-7 días), con respecto a un control negativo (medio control) y un control positivo (medio control + RANKL, en ausencia de ATP).

#### i. Anhidrasa Carbónica.

**Fig. 10 Expresión de Anhidrasa Carbónica en células RAW 264.7 posterior a estímulo de ATP en distintos días**



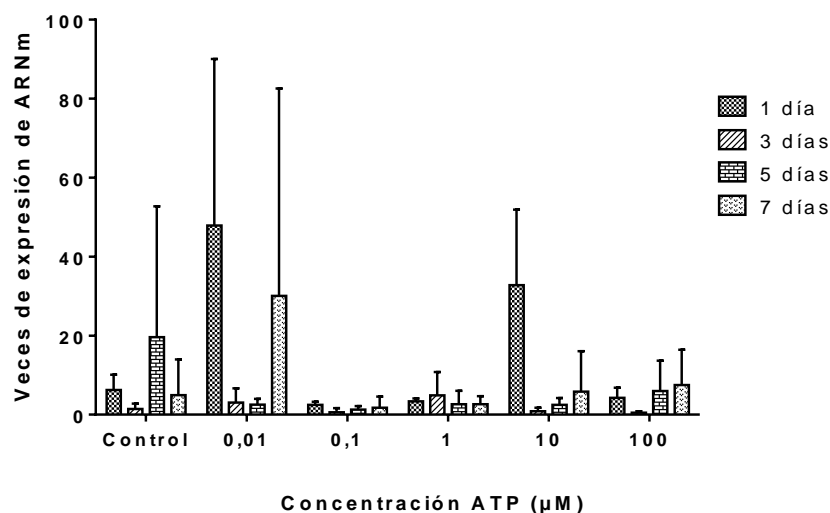
Detección a través de qPCR de ARNm de Anhidrasa Carbónica en células RAW 264.7 posterior a estímulo con ATP 0.01, 01, 1, 10 y 100 μM (n=4). Resultados normalizados respecto a GAPDH en la condición control. Test ANOVA de dos vías y Bonferroni para comparaciones múltiples. Las barras muestran valores expresados como media ± error estándar. No se encontró significancia para ninguna de las comparaciones.

Al analizar la expresión de Anhidrasa Carbónica posterior al estímulo de ATP (Fig. 10), no se evidenciaron diferencias significativas entre las distintas concentraciones utilizadas respecto al control en ninguno de los días estudiados. Sin embargo, al analizar los resultados de manera independiente (cada "n" por separado), se apreció que para los días 1 y 3 hubo un aumento de su expresión de entre 2 a 6 veces en las concentraciones menores a 100 μM. En los otros días no existió aumento de su expresión para las concentraciones de ATP estudiadas.

En los resultados analizados de manera independiente, se observó que tanto para RANKL como para ATP 0,01-100 μM, la expresión de Anhidrasa Carbónica presentó un aumento de expresión temprano (1 día), que fue disminuyendo a medida que aumentaban los días de estudio.

## ii. ATPasa.

**Fig. 11 Expresión de ATPasa en células RAW 264.7 posterior a estímulo de ATP en distintos días**



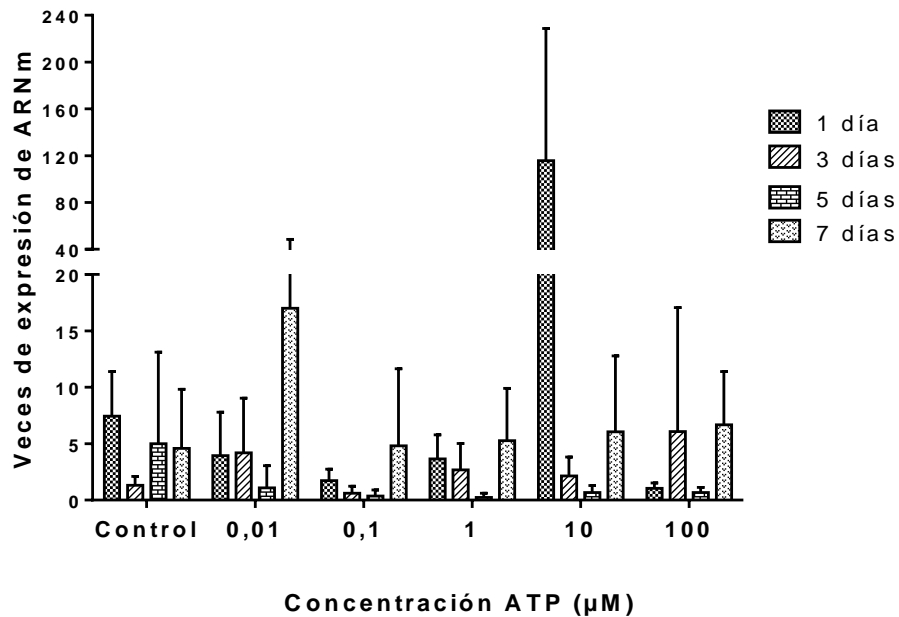
Detección a través de qPCR de ARNm de ATPasa en células RAW 264.7 posterior a estímulo con ATP 0.01, 01, 1, 10 y 100 μM (n=4). Resultados normalizados respecto a GAPDH en la condición control. Test ANOVA de dos vías y Bonferroni para comparaciones múltiples. Las barras muestran valores expresados como media ± error estándar. No se encontró significancia para ninguna de las comparaciones.

Para la expresión de ATPasa posterior al estímulo de ATP (Fig. 11), no se encontraron diferencias significativas entre las distintas concentraciones utilizadas con respecto al control en ninguno de los días estudiados. Al analizar los experimentos de manera independiente, se apreció que para los días 1 y 7 hubo aumento de su expresión de 5 a 8 y 2 a 6 veces, respectivamente. Además, en estos días de estudio, se evidenció que las concentraciones 10 y 0,01 μM de ATP mostraron de manera independiente una mayor expresión de ATPasa.

Luego de analizar los resultados cada uno de manera independiente, en las condiciones RANKL y concentraciones menores a 10 μM de ATP, la expresión de ATPasa fue mayor para los días 1 y 7.

**iii. CTK.**

**Fig. 12 Expresión de CTK en células RAW 264.7 posterior a estímulo de ATP en distintos días**

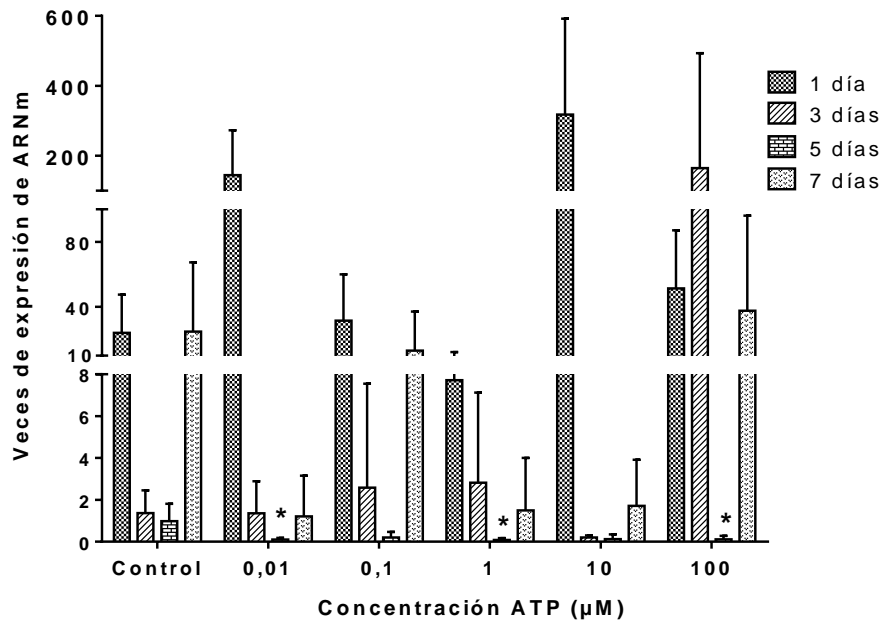


Detección a través de qPCR de ARNm de CTK en células RAW 264.7 posterior a estímulo con ATP 0.01, 01, 1, 10 y 100 μM (n=4). Resultados normalizados respecto a GAPDH en la condición control. Test ANOVA de dos vías y Bonferroni para comparaciones múltiples. No se encontró significancia para ninguna de las comparaciones.

Con respecto a la expresión de CTK posterior al estímulo de ATP (Fig. 12), no se evidenciaron diferencias significativas en ninguna concentración propuesta. Sin embargo, luego de analizar de manera independiente los experimentos realizados, se evidenció un aumento de su expresión 3 a 60 veces para 3 “n” en la concentración 10 μM al día 1 y de 3 veces para tres “n” en la concentración 0,01 μM para el día 7.

#### iv.MMP-9.

**Fig. 13 Expresión de MMP-9 en células RAW 264.7 posterior a estímulo de ATP en distintos días**



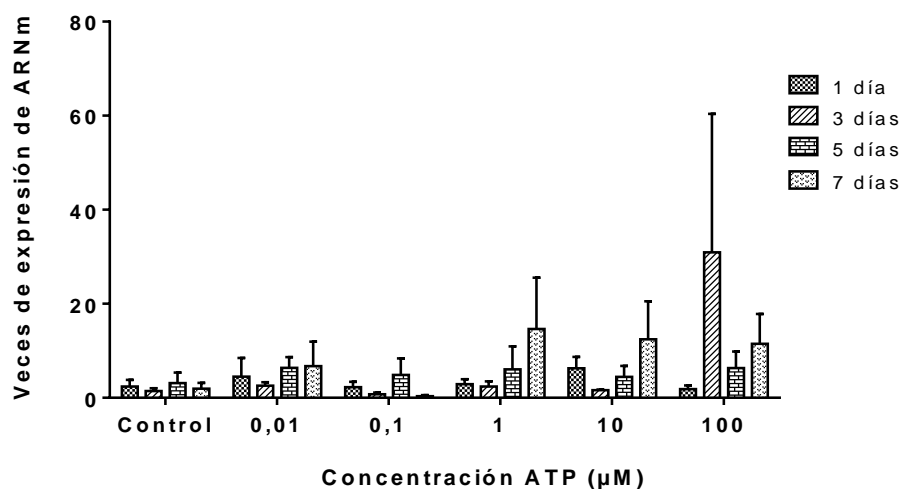
Detección a través de qPCR de ARNm de MMP-9 en células RAW 264.7 posterior a estímulo con ATP 100, 10, 1, 0.1 y 0.01 μM (n=4). Resultados normalizados respecto a GAPDH en la condición control. Test ANOVA de dos vías y Bonferroni para comparaciones múltiples. Las barras muestran valores expresados como media ± error estándar. \*: p < 0,05.

Los resultados obtenidos luego de la estimulación con ATP (Fig. 13) evidenciaron diferencias significativas al día 5 de estudio en las concentraciones 100, 1 y 0,01 μM de ATP con respecto al control. Sin embargo, al momento de analizar las veces de expresión, se observó que ésta disminuyó luego de la estimulación con ATP.

Por otro lado, al momento de analizar de manera independiente cada uno de los experimentos, se evidenció aumento de su expresión hasta 150 veces en el día 1 para todas las concentraciones propuestas.

**v. TRAP.**

**Fig. 14 Expresión de TRAP en células RAW 264.7 posterior a estímulo de ATP en distintos días**



Detección a través de qPCR de ARNm de TRAP en células RAW 264.7 posterior a estímulo con ATP 100, 10, 1, 0.1 y 0.01 μM (n=4). Resultados normalizados respecto a GAPDH en la condición control. Test ANOVA de dos vías y Bonferroni para comparaciones múltiples. Las barras muestran valores expresados como media ± error estándar. No se encontró significancia para ninguna de las comparaciones.

Luego de la estimulación con las distintas concentraciones de ATP (Fig. 14) no se evidenciaron diferencias significativas con el control. Por otro lado, al analizar los experimentos de manera independiente se encontró un aumento de su expresión entre 2 a 20 veces en la concentración 100 μM para el día 3 y de 6 a 7 veces al día 7 para las concentraciones de 10 μM y 1 μM.

En base a lo observado en cada uno de los ensayos propuestos y a las herramientas estadísticas utilizadas, se puede establecer que los resultados con respecto a la estimulación de ATP parecen ser poco contundentes cuando se analizan a través del promedio, debido a la alta dispersión de datos. Sin embargo, cuando se analiza cada experimento de manera independiente (cada "n" por separado), se observa que

todos los marcadores de osteoclastogénesis aumentan a concentraciones o días de incubación con ATP determinados. Por lo tanto, es necesario aumentar el tamaño muestral para reducir la dispersión de datos y lograr la significancia estadística necesaria.



## X. DISCUSIÓN.

En el presente trabajo se estudió específicamente el rol del ATP extracelular en la diferenciación de monocitos a osteoclastos, células encargadas de la resorción durante la remodelación ósea. Los resultados obtenidos permitieron caracterizar la expresión de 6 subtipos de receptores purinérgicos (P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>7</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>6</sub> y P2Y<sub>12</sub>) en células RAW 264.7. Una vez detallada la expresión de estos receptores, se estudió la expresión de marcadores de osteoclastogénesis posterior al estímulo de ATP, en función de distintas concentraciones y días de estudio. Se evidenció aumento de la expresión de los marcadores para distintas concentraciones y días, por lo que es posible sugerir que el ATP estaría actuando a favor del proceso de diferenciación a osteoclastos, sin embargo debido a la alta dispersión de los datos obtenidos, se hace necesario aumentar la cantidad de experimentos realizados para obtener resultados contundentes.

### 1. Expresión de receptores purinérgicos

Previo al estudio de la expresión de receptores purinérgicos, los resultados con respecto a la presencia de marcadores de osteoclastos entregaron diferencias significativas luego de la estimulación con RANKL por 5 días para TRAP, CTK, MMP-9 y ATPasa, donde se evidencian aumento de expresión de cientos a miles de veces. Sin embargo al analizar Anhidrasa Carbónica, se encontró que la diferencia significativa con respecto al control no era significativa. Esto ocurre porque, pese a que los cuatro experimentos independientes realizados a la expresión de Anhidrasa Carbónica aumentan tras el estímulo de RANKL, hay una alta dispersión de datos. Por tanto, se propone como solución a este problema aumentar la cantidad de repeticiones de este experimento para lograr significancia estadística.

## 2. Expresión de receptores purinérgicos

Distintos estudios han demostrado la presencia de receptores purinérgicos en la mayoría de las células de mamíferos, incluyendo células del tejido óseo. También se ha evidenciado que las células de este tejido son capaces de liberar ATP al medio extracelular (Li, y cols., 2014; Rumney y cols., 2012; Pelagatti y cols., 2011; Evans y cols., 2006), lo que tendría un efecto autocrino y paracrino (Kringelbach y cols, 2015; Agrawal, 2015). Con respecto a los receptores purinérgicos, aún no existe consenso acerca de cuáles son los subtipos específicos ni en qué tipo de célula ósea específica se encuentran. Además, pocos estudios han demostrado la expresión funcional de estos receptores purinérgicos.

Para la familia de receptores purinérgicos P2X<sub>1-7</sub> se describe su presencia en osteoblastos y osteoclastos, sin embargo solamente los receptores P2X<sub>4</sub> y P2X<sub>7</sub> poseen evidencia de expresión funcional en osteoclastos. (Reyes y cols., 2011; Grol, y cols., 2009; Hazama y cols., 2009). Se ha descrito que el receptor purinérgico P2X<sub>7</sub> permite establecer comunicación entre osteoblastos y osteoclastos inducida por estímulo mecánico, siendo un actor relevante en la mecano-transducción de señales que generen la mantención de la masa ósea (Kringelbach y cols., 2015; Kvist y cols., 2014; Brandao-Burch, 2012; Li y cols., 2009). Diferentes estudios muestran que la inhibición de este receptor en células RAW 264.7 provoca la inhibición de marcadores de osteoclastos, tales como CTK y TRAP, claves en la diferenciación y activación de este tipo celular (Reyes y cols., 2011). Con respecto al receptor purinérgico P2X<sub>4</sub>, su localización también se describe en osteoclastos, sin embargo aún no es posible descubrir cuál es su función específica a nivel de tejido óseo (Lenertz y cols., 2015).

Los resultados de la literatura que evidencian la expresión de receptores P2X, son concordantes con los obtenidos a partir del modelo de cultivo celular presentado en este trabajo, ya que existió la expresión específica de estos dos receptores (P2X<sub>4</sub> y P2X<sub>7</sub>), junto con la expresión del receptor P2X<sub>3</sub> posterior a la estimulación con RANKL en células RAW 264.7.

Por otro lado, al analizar la expresión de la familia de receptores purinérgicos P2Y luego de la estimulación con RANKL en el cultivo celular propuesto, se obtuvo la expresión de receptores P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>6</sub> y P2Y<sub>12</sub>. Al contrastar este resultado con la literatura, es posible evidenciar una diferencia interesante con respecto a los distintos nucleótidos que se proponen como activadores de estos receptores (Hajjawi y cols., 2016; Wang y cols., 2013; Ham y Evans, 2012). Por ejemplo, para el receptor P2Y<sub>2</sub> se especifica que los nucleótidos ATP y UTP son capaces de activarlos con similar potencia. Por otro lado, se ha demostrado que el tratamiento por varios días con altas concentraciones de fosfato (Pi) extracelular, un metabolito presente luego de la acción de ecto-nucleatidasas del medio externo, inhibe la diferenciación de células RAW 264.7, causando apoptosis e inhibiendo la señalización RANK-RANKL, pero que en concentraciones fisiológicas su presencia en el medio extracelular potenciaría la actividad de osteoclastos (Li y cols., 2017; Baroja-Mazo y cols., 2012).

Se ha considerado que específicamente en osteoclastos, los receptores P2Y<sub>13</sub> son potentes estimuladores de pérdida de masa ósea con estímulos de ADP. (Biver y cols., 2013; Rumney y cols., 2012). Con respecto a los receptores P2Y<sub>6</sub>, se ha propuesto que cumplen una función inhibidora de apoptosis en osteoclastos, lo que sería un rol antagonista con respecto al receptor P2X<sub>7</sub> (Orriss y cols., 2012). A pesar de que nuestros resultados sugieren la expresión del receptor P2Y<sub>12</sub> y que Buckley y cols. también evidenciaron su expresión en osteoclastos, no existe aún una descripción que permita saber si esta expresión es o no funcional (Reyes y cols., 2011)

Por otro lado, Lenertz y cols. demuestran que en ratones knockout de receptores purinérgicos P2X<sub>7</sub>, P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>6</sub> y P2Y<sub>13</sub> presentan anomalías esqueléticas (Lenertz y cols., 2015). Sin embargo, el estudio de la importancia de los receptores purinérgicos en el desarrollo del sistema esquelético entrega resultados variables propuestos en la literatura.

Teniendo en cuenta que los resultados obtenidos en este trabajo demuestran la expresión de receptores P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>7</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>6</sub> y P2Y<sub>12</sub> en células RAW 264.7 en estado de monocitos y osteoclastos, es importante considerar que su activación permite la realización de variadas funciones en el sistema musculoesquelético, la presencia de polimorfismos del receptor P2X<sub>4</sub> se ha asociado a riesgos de osteoporosis (Wang y cols., 2013). El receptor P2X<sub>7</sub> participa activamente en el desarrollo musculoesquelético (Burnstock y cols., 2013). Se ha propuesto, además, la participación del receptor P2Y<sub>13</sub> en la disminución de la masa ósea y la homeostasis de este sistema (Jorgensen y cols., 2002; Buckley y cols., 2002). Se ha descrito un aumento de masa ósea en ratones knockout de P2Y<sub>2</sub> y una disminución de masa ósea en ratones knockout de P2Y<sub>6</sub> (Lenertz y cols., 2015). Finalmente, se ha demostrado el rol determinante del receptor P2Y<sub>12</sub> en la mantención de la masa ósea (Lenertz y cols., 2015). Por lo tanto es deducible que cualquier alteración de estos receptores generaría importantes consecuencias en el desarrollo del sistema musculoesquelético.

Los resultados obtenidos en este trabajo con respecto a la presencia o ausencia de expresión de estos receptores en células RAW 264.7, son coherentes con lo señalado en la literatura. Se analizó además si existe diferencia de expresión de los subtipos de receptores P2X/P2Y en estas células en estado de monocitos o luego de diferenciarlas a osteoclastos. Pese a que no se encontraron diferencias significativas al analizar de manera independiente cada uno de los experimentos, se reconocen aumentos de expresión de los receptores P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>7</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>6</sub> y P2Y<sub>12</sub> con aumento de hasta 40 veces, alrededor de 2 veces, hasta 30 veces, hasta 80 veces, hasta 30 veces y alrededor de 80 veces, respectivamente. La falta de significancia probablemente se deba a la gran dispersión de datos, por lo que se requiere aumentar el tamaño muestral para poder concluir adecuadamente. Sin embargo, los resultados obtenidos sugieren que los receptores propuestos aumentan su expresión con la diferenciación monocito-osteoclastos, pudiendo cumplir un rol diferencial en cada uno de estos estadios (De Ita y cols., 2016; Lioi y cols., 2015).

3. Evaluación de posible diferenciación a osteoclasto a partir de ATP extracelular. Dependencia de la concentración y el tiempo de exposición.

A la actualidad no existe ningún estudio que analice detalladamente la temporalidad de la expresión funcional de marcadores de osteoclastos. Por ejemplo, el detalle de la funcionalidad presentado por Soysa y cols. guarda relación con el análisis cualitativo, donde se establecen criterios fenotípicos para las etapas de diferenciación y activación de osteoclastos, es decir, se asocia la expresión de ciertas proteínas con la secuencia que va desde monocito hasta el osteoclastos maduro y funcional (Soysa y cols., 2011). En ese sentido, los resultados obtenidos para los marcadores estudiados entregan un análisis más detallado que el aportado por la literatura.

Al analizar el marcador Anhidrasa Carbónica se evidenció un aumento de expresión en el día 3 luego de la estimulación con RANKL. Además, como se señaló anteriormente, probablemente el aumento del número de repeticiones de este experimento permitiría encontrar diferencias significativas para los días 1, 5 y 7. Por otro lado, al estudiar los resultados de su expresión posterior al estímulo con diferentes concentraciones de ATP, donde pese a no existir diferencia significativa en los promedios, el análisis individual muestra un aumento de expresión en las concentraciones menores a 100  $\mu\text{M}$  para los días 1 y 3. Este resultado se podría explicar al considerar que Anhidrasa Carbónica juega un papel importante en la maquinaria proteica que permite la diferenciación de osteoclastos, asociándose desde etapas tempranas de este proceso celular (Bernhardt y cols, 2017; Long y cols., 2012; Grossardt y cols., 2010; Neutzsky-Wulff y cols., 2010; Lehenkari y cols., 1998).

Con respecto al marcador ATPasa, el análisis estadístico concluyó en que solamente al día 5 existió diferencia significativa en su expresión posterior a la estimulación con RANKL. A pesar de esto, los resultados para los otros días resultaron ser alentadores

para hallar también diferencias significativas si se aumenta el número de experimentos realizados. Sin embargo, luego de la estimulación con ATP no se evidenciaron diferencias en los días de estudio. Tras analizar estos datos de manera independiente, se evidenció aumento de expresión para los días 1 y 7 en concentraciones 1 y 0,01  $\mu\text{M}$  de ATP. Al contrastar estos resultados con la literatura, resulta interesante las diferencias halladas, pues se asocia la expresión de esta enzima a etapas avanzadas en la diferenciación de osteoclastos (Marcoline y cols., 2016; Soysa y cols., 2012), sin embargo para el día 1 existe un aumento considerable de su expresión en cada uno de los experimentos realizados.

En el estudio del comportamiento del marcador CTK, se estableció una diferencia significativa al día 5 posterior a la estimulación con RANKL en comparación a su control. Además, al analizar de acuerdo al análisis de los ensayos individuales, podrían existir diferencias significativas para los días 1 y 3 aumentando el número de experimentos. Por otro lado, posterior a la estimulación con ATP, se observa que al analizar los resultados de manera independiente, existe un aumento de la expresión de CTK al día 1 y 7 para las concentraciones 10 y 0,01  $\mu\text{M}$ . Este comportamiento asociado a las dos condiciones propuestas, tiene coincidencia con la descripción de la funcionalidad de CTK en el proceso de diferenciación de osteoclastos, puesto que se describe como una importante molécula en la actividad en este tipo celular (Bernhardt y cols., 2017).

Los resultados para el marcador MMP-9 mostraron una diferencia significativa posterior a la estimulación con RANKL para los días 1 y 5. Además, probablemente con el aumento del número de experimentos para el día 3, también se hubiese encontrado diferencia significativa. El efecto del ATP para este marcador fue muy interesante. Luego de 1 día de incubación con ATP, a todas las concentraciones estudiadas y en todos los "n" de manera independiente, hubo un aumento en la expresión de MMP-9 (aunque no alcanzó significancia debido a la alta dispersión de los datos). Sin embargo, luego de 5 días de incubación con ATP 0,01-100  $\mu\text{M}$ , hubo una disminución significativa de la expresión de MMP-9 respecto del nivel basal. Esto

es muy interesante, porque sugiere un rol dual del ATP dependiendo de la temporalidad de acción. Y, además, porque no se ha descrito previamente algún otro estímulo que pueda regular negativamente la expresión de MMP-9 en monocitos/osteoclastos. Por lo tanto, este es un punto interesante para futuros estudios

Finalmente, al analizar el marcador TRAP, se observó que posterior a la estimulación con RANKL, existió una diferencia significativa en los días 3 y 5. Además, posterior a la estimulación con ATP no se obtuvieron diferencias significativas entre estas condiciones y el control. Al analizar de manera independiente cada uno de los experimentos, se evidenció aumento de expresión de TRAP en los días 3 y 7

Como resumen del análisis de cada uno de los marcadores de diferenciación de osteoclastos se obtuvieron los siguientes resultados:

- Posterior al estímulo con RANKL, existió una diferencia significativa en todos los marcadores en el día 5 y, además, para MMP-9 y TRAP se obtuvo diferencias significativas para el día 1 y 3, respectivamente. Por otro lado, analizando los resultados de manera independiente, ATPasa mostró aumento de expresión al día 7.
- Posterior al estímulo con las diferentes concentraciones de ATP, se evidenció diferencia significativa solamente para MMP-9 al día 5 en las concentraciones 0,01, 1 y 100  $\mu\text{M}$ . Al analizar estos resultados de manera independiente, se observó que existe un aumento de la expresión en todos los marcadores luego del estímulo con concentraciones menores a 10  $\mu\text{M}$ . Además, estos aumentos de expresión se asociaron a partir del día 1 de estudio para Anhidrasa Carbónica, ATPasa, CTK y MMP-9. En cambio para TRAP, analizando los datos de manera independiente, se evidenció aumento de expresión a partir del día 3.

Lo anterior se puede relacionar con lo descrito en la literatura, donde se especifica que aquellos marcadores son altamente específicos para evidenciar la diferenciación de osteoclastos (Bernhardt y cols., 2017; Merrild y cols., 2015; Crockett y cols., 2011; Soysa y cols., 2011; Boyle y cols., 2003), por lo que se esperaría encontrar su aumento de expresión a partir de la estimulación prolongada con RANKL. Por otro lado, se debe destacar que al analizar el comportamiento de expresión para estos marcadores bajo el estímulo de distintas concentraciones de ATP, se evidenció un aumento de su expresión luego del estímulo con concentraciones menores a 10  $\mu\text{M}$ , lo que resulta coherente con lo descrito por la literatura (Hajjawi y cols., 2016; Miyazaki y cols., 2012; Costa y cols., 2011; Hiken y Steinberg, 2004; Hoebertz y cols., 2003; Morrison y cols., 1998). Con respecto a lo visto en los resultados obtenidos, es posible elaborar dos posibles causas de este comportamiento: 1. Se ha evidenciado que altas concentraciones de ATP ( $>10 \mu\text{M}$ ) exógeno en células RAW 264.7 generan muerte celular e inhibición de la fusión celular para formar células multinucleadas, reportándose incluso la pérdida de funcionalidad del receptor  $\text{P2X}_7$  (Hiken y Steinberg, 2004). 2. La utilización de altas concentraciones de ATP podrían provocar una rápida diferenciación de las células RAW 264.7 a osteoclastos, por lo que el requerimiento metabólico aumentaría drásticamente con el paso de los días, causando escasez de recursos presentes en el medio de cultivo lo que conduciría a muerte celular. Estas dos posibilidades podrían ser la causa de la disminución de expresión de estos marcadores bajo la estimulación de las células con una concentración de 100  $\mu\text{M}$  de ATP.



## **XI. CONCLUSIONES.**

La caracterización detallada de la expresión de receptores purinérgicos en células RAW 264.7 en estado monocítico, permite direccionar futuras investigaciones que evalúen la activación de estos receptores producto de la presencia de ATP liberado por otros tipos celulares, como por ejemplo, células musculares, cuya relación molecular aún se desconoce, más aún a nivel del sistema masticatorio.

Si bien fue posible evidenciar la expresión de los marcadores que representan la diferenciación de osteoclastos, no se observaron diferencias significativas en su expresión posterior a la estimulación de diferentes concentraciones de ATP durante distintos días. Sin embargo, realizando un análisis de manera independiente para cada una de las condiciones propuestas, se pudo evidenciar que ATP aumenta la expresión de estos marcadores en condiciones específicas, pero que debido a la dispersión de los datos, al momento de trabajar en base a promedios no reflejaron significancia estadística, por lo que se sugiere que aumentando el tamaño muestral podrían encontrarse resultados contundentes con respecto a la acción del ATP extracelular sobre osteoclastos. Por otro lado, es posible que se encuentren mayores niveles de expresión de estos marcadores cuando exista el estímulo previo de RANKL al momento de exponer las células a ATP, pensando que el ATP podría actuar como co-activador junto a RANKL.

Detallar el rol de ATP extracelular en la diferenciación y actividad de osteoclastos y el resto de las células óseas, permitiría comprender cómo se comporta la expresión de estos marcadores, así como también entregar las primeras líneas en la búsqueda de soluciones terapéuticas moleculares en patologías que presenten alteraciones de masa ósea, como el caso de la osteoporosis (Kanaya y cols., 2016; Lee y cols., 2013; North y Jarvis, 2013; Wesselius y cols., 2012), osteopenia (Kvist y cols., 2014) e incluso periodontitis, donde se ha comprobado la existencia de una alta cantidad de expresión

de receptores purinérgicos en muestras de ligamento periodontal (Ramos-Junior y cols., 2015; Kanjanamekanant y cols., 2014; Binderman y cols., 2014; Luckprom y cols., 2010).

## XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, et al. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacological reviews*. 2006;58(3):281-341.
2. Agrawal AG. A P2X7 receptors: Role in bone cell formation and function. *J Mol Endocrinol*. 2015; 54(2):R75-88.
3. Alzghoul MB, Gerrard D, Watkins BA., Hannon K. Ectopic expression of IGF-I and Shh by skeletal muscle inhibits disuse-mediated skeletal muscle atrophy and bone osteopenia in vivo. *FASEB J*. 2004;18(1):221-3.
4. Andersen TL, Sondergaard TE, Skorzynska KE, Dagnaes-Hansen F, Plesner TL, Hauge EM, et al. A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone. *The American journal of pathology*. 2009;174(1):239-47.
5. Baroja-Mazo A, Pelegrin P. Modulating P2X7 Receptor Signaling during Rheumatoid Arthritis: New Therapeutic Approaches for Bisphosphonates. *Journal of osteoporosis*. 2012;408242.
6. Bernhardt A, Koperski K, Schumacher M, Gelinsky M. Relevance of osteoclast-specific enzyme activities in cell-based in vitro resorption assays. *European cells & materials*. 2017;33:28-42.
7. Binderman I, Gadban N, Yaffe A. Cytoskeletal disease: a role in the etiology of adult periodontitis. *Oral diseases*. 2014;20(1):10-6.
8. Biver G, Wang N, Gartland A, Orriss I, Arnett, TR, Boeynaems JM, Robaye B. Role of the P2Y13 receptor in the differentiation of bone marrow stromal cells into osteoblasts and adipocytes. *Stem Cells*. 2013;31:2747–58.
9. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003;423(6937):337-42.

10. Brandao-Burch A, Key ML, Patel JJ, Arnett TR, Orriss IR. The P2X7 Receptor is an Important Regulator of Extracellular ATP Levels. *Frontiers in endocrinology*. 2012;3:41.
11. Brotto M, Johnson ML. Endocrine crosstalk between muscle and bone. *Current osteoporosis reports*. 2014;12(2):135-41.
12. Buckwalter J, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone Biology. *J Bone Joint Surg Am*. 1995;77:1256-75.
13. Buckley KA, Hipskind RA, Gartland A, Bowler WB, Gallagher JA. Adenosine triphosphate stimulates human osteoclast activity via upregulation of osteoblast-expressed receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand. *Bone*. 2002;31(5):582-90.
14. Burnstock G. Purinergic P2 receptors as targets for novel analgesics. *Pharmacol Ther*. 2006;110(3), 433-454.
15. Burnstock G, Arnett TR, Orriss IR. Purinergic signalling in the musculoskeletal system. *Purinergic signalling*. 2013;9(4):541-72.
16. Bustamante M, Fernandez-Verdejo R, Jaimovich E, Buvinic S. Electrical stimulation induces IL-6 in skeletal muscle through extracellular ATP by activating Ca(2+) signals and an IL-6 autocrine loop. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2014;306(8):E869-82.
17. Buvinic S, Almarza G, Bustamante M, Casas M, Lopez J, Riquelme M, et al. ATP released by electrical stimuli elicits calcium transients and gene expression in skeletal muscle. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(50):34490-505.
18. Buvinic S, Briones R, Huidobro-Toro JP. P2Y(1) and P2Y(2) receptors are coupled to the NO/cGMP pathway to vasodilate the rat arterial mesenteric bed. *Br J Pharmacol*. 2002;136(6), 847-856.
19. Casas M, Buvinic S, Jaimovich E. ATP signaling in skeletal muscle: from fiber plasticity to regulation of metabolism. *Exercise & Sport Sciences Reviews*. 2014;42(3):110-6.
20. Cediell JF, Cárdenas MH, García A, Chuairé L, Payán C, Villegas V, Sánchez C. *Manual de Histología. Tejidos fundamentales* (U. d. Rosario Ed.). Bogotá D.C.: Universidad Colegio Mayor de Nuestra Señora del Rosario. 2009.
21. Cheung WY, Fritton JC, Morgan SA, Seref-Ferlengez Z, Basta-Pljakic J, Thi MM, et al. Pannexin-1 and P2X7-Receptor Are Required for Apoptotic Osteocytes in Fatigued Bone to Trigger RANKL Production in Neighboring Bystander Osteocytes. *Journal of*

bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research. 2016;31(4):890-9.

22. Chromiak J, Antonio J. Skeletal Muscle Plasticity. Essentials of Sports Nutrition and Supplements. 2008: 21-52.
23. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN. 2008;3 Suppl 3:S131-9.
24. Costa MA, Barbosa A, Neto E, Sa-e-Sousa A, Freitas R, Neves JM, et al. On the role of subtype selective adenosine receptor agonists during proliferation and osteogenic differentiation of human primary bone marrow stromal cells. Journal of cellular physiology. 2011;226(5):1353-66.
25. Costessi A, Pines A, D'Andrea P, Romanello M, Damante G, Cesaratto L, et al. Extracellular nucleotides activate Runx2 in the osteoblast-like HOBIT cell line: a possible molecular link between mechanical stress and osteoblasts' response. Bone. 2005;36(3):418-32.
26. Crockett J, Rogers MJ, Coxon FP, Hocking LJ, Helfrich MH. Bone remodelling at a glance. Journal of cell science. 2011;124:991-8.
27. Cuccia A, Caradonna C. The relationship between the stomatognathic system and body posture. Clinics. 2009; 64(1): 61-66.
28. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. Journal of clinical pathology. 2008;61(5):577-87.
29. De Ita M, Vargas MH, Carbajal V, Ortiz-Quintero B, Lopez-Lopez C, Miranda-Morales M, et al. ATP releases ATP or other nucleotides from human peripheral blood leukocytes through purinergic P2 receptors. Life sciences. 2016;145:85-92.
30. Durham J, Newton-John TRO, Zakrzewska Jm. Temporomandibular disorders. BMJ. 2015;350:h1154.
31. Eriksen EF. Cellular mechanisms of bone remodeling. Reviews in endocrine & metabolic disorders. 2010;11(4):219-27.
32. Evans BA, Elford C, Pexa A, Francis K, Hughes AC, Deussen A, et al. Human osteoblast precursors produce extracellular adenosine, which modulates their secretion of IL-6 and osteoprotegerin. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research. 2006;21(2):228-36.

33. Everts DJ, Korper W, Jansen DC, Tigchelaar-Gutter W, Saftig P, Beertsen W. The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J Bone Miner Res.* 2002;17(1):77-90.
34. Fernandez-Verdejo R, Casas M, Galgani JE, Jaimovich E, Buvinic S. Exercise sensitizes skeletal muscle to extracellular ATP for IL-6 expression in mice. *Int J Sports Med.* 2014;35(4), 273-279.
35. Fields RD, Burnstock G. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7(6), 423-436.
36. Fitzgerald RH, Kaufer H, Malkani AL. *Ortopedia (Vol. I).* Argentina. 2004.
37. Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simoes MJ, Cerri PS. *Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells.* BioMed research international. 2015;421746.
38. Gallagher JA. ATP P2 receptors and regulation of bone effector cells. *J Musculoskeletal Neuronal Interact.* 2004;4(2):125-7.
39. Grol MW, Panupinthu N, Korcok J, Sims SM, Dixon SJ. Expression, signaling, and function of P2X7 receptors in bone. *Purinergic signalling.* 2009;5(2):205-21.
40. Grossardt C, Ewald A, Grover LM, Barralet JE, Gbureck U. Passive and active in vitro resorption of calcium and magnesium phosphate cements by osteoclastic cells. *Tissue Eng Part A.* 2010;16: 3687-3695.
41. Hajjawi MO, Patel JJ, Corcelli M, Arnett TR, Orriss IR. Lack of effect of adenosine on the function of rodent osteoblasts and osteoclasts in vitro. *Purinergic signalling.* 2016;12(2):247-58.
42. Ham J, Evans BA. An emerging role for adenosine and its receptors in bone homeostasis. *Frontiers in endocrinology.* 2012;3:113.
43. Harry LE, Sandison A, Paleolog EM, Hansen U, Pearse MF, Nanchahal J. Comparison of the healing of open tibial fractures covered with either muscle or fasciocutaneous tissue in a murine model. *Journal of Orthopaedic Research.* 2008;26(9):1238-44.
44. Hazama R, Qu X, Yokoyama K, Tanaka C, Kinoshita E, He J, et al. ATP-induced osteoclast function: the formation of sealing-zone like structure and the secretion of lytic granules via microtubule-deacetylation under the control of Syk. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms.* 2009;14(7):871-84.
45. Hiken JF, Steinberg TH. ATP downregulates P2X7 and inhibits osteoclast formation in RAW cells. *American journal of physiology Cell physiology.* 2004;287 C403–C12.

46. Hoebertz A, Arnett TR, Burnstock G. Regulation of bone resorption and formation by purines and pyrimidines. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2003;24(6):290-7.
47. Hoebertz S, Burnstock G, Arnett T. Extracellular ADP is a powerful osteolytic agent: evidence for signaling through the P2Y1 receptor on bone cells. *FASEB J*. 2001;15(7):1139-48.
48. Isaacson J, Brotto M. Physiology of Mechanotransduction: How Do Muscle and Bone "Talk" to One Another? *Clinical reviews in bone and mineral metabolism*. 2014;12(2):77-85.
49. Jorgensen NR, Henriksen Z, Sorensen OH, Eriksen EF, Civitelli R, Steinberg TH. Intercellular calcium signaling occurs between human osteoblasts and osteoclasts and requires activation of osteoclast P2X7 receptors. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(9):7574-80.
50. Jorquera G, Altamirano F, Contreras-Ferrat A, Almarza G, Buvinic S, Jacquemond V, et al. Cav1.1 controls frequency-dependent events regulating adult skeletal muscle plasticity. *Journal of cell science*. 2013;126(Pt 5):1189-98.
51. Juhasz-Böss I, Fehm T, Ney JT, Solomayer EF. Pathophysiology of Bone Remodelling and Current Therapeutic Approaches. *Geburtshilfe Und Frauenheilkunde*. 2012;72(6), 502–506.
52. Kanaya K, Iba K, Abe Y, Dohke T, Okazaki S, Matsumura T, et al. Acid-sensing ion channel 3 or P2X2/3 is involved in the pain-like behavior under a high bone turnover state in ovariectomized mice. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2016;34(4):566-73.
53. Kanjanamekanant K, Luckprom P, Pavasant P. P2X7 receptor-Pannexin1 interaction mediates stress-induced interleukin-1 beta expression in human periodontal ligament cells. *Journal of periodontal research*. 2014;49(5):595-602.
54. Kini U, Nandeesh BN. Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism. 2012;29-57.
55. Korcok J, Raimundo LN, Du X, Sims SM, Dixon SJ. P2Y6 nucleotide receptors activate NF-kappaB and increase survival of osteoclasts. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(17):16909-15.
56. Kringelbach TM, Aslan D, Novak I, Ellegaard M, Syberg S, Andersen CK, et al. Fine-tuned ATP signals are acute mediators in osteocyte mechanotransduction. *Cellular signalling*. 2015;27(12):2401-9.

57. Kvist TM, Schwarz P, Jorgensen NR. The P2X7 receptor: a key player in immune-mediated bone loss? *TheScientificWorldJournal*. 2014;954530.
58. Laurent MR, Dubois V, Claessens F, Verschueren SM, Vanderschueren D, Gielen E, et al. Muscle-bone interactions: From experimental models to the clinic? A critical update. *Molecular and cellular endocrinology*. 2016;432:14-36.
59. Lazarowski ER, Boucher RC y Harden TK. Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Mol Pharmacol*. 2003;64(4), 785-795.
60. Lee SA, Park JH, Lee SY. Selective induction of P2Y14 receptor by RANKL promotes osteoclast formation. *Molecules and cells*. 2013;36(3):273-7.
61. Lehenkari P, Hentunen TA, Laitala-Leinonen T, Tuukkanen J, Väänänen HK. Carbonic anhydrase II plays a major role in osteoclast differentiation and bone resorption by effecting the steady state intracellular pH and Ca<sup>2+</sup>. *Exp Cell Res*. 1998;242: 128-137.
62. Lenertz LY, Baughman CJ, Waldschmidt NV, Thaler R, van Wijnen AJ. Control of bone development by P2X and P2Y receptors expressed in mesenchymal and hematopoietic cells. *Gene*. 2015;570(1):1-7.
63. Li G, Miura K, Kuno M. Extracellular phosphates enhance activities of voltage-gated proton channels and production of reactive oxygen species in murine osteoclast-like cells. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2017;469(2):279-92.
64. Li J, Meyer R, Duncan RL, Turner CH. P2X7 nucleotide receptor plays an important role in callus remodeling during fracture repair. *Calcified tissue international*. 2009;84(5):405-12.
65. Li P, Liu C, Hu M, Long M, Zhang D, Huo B. Fluid flow-induced calcium response in osteoclasts: signaling pathways. *Annals of biomedical engineering*. 2014;42(6):1250-60.
66. Lim JC, Mitchell CH. Inflammation, pain, and pressure--purinergic signaling in oral tissues. *Journal of dental research*. 2012;91(12):1103-9.
67. Lioi AB, Ferrari BM, Dubyak GR, Weinberg A, Sieg SF. Human beta Defensin-3 Increases CD86 Expression on Monocytes by Activating the ATP-Gated Channel P2X7. *Journal of immunology*. 2015;195(9):4438-45.
68. Long T, Hong F, Shen S, Wang L, Wang Y, Wang J. In vitro degradation of electrodeposited calcium phosphate coatings by osteoclast-like cells. *Biomed Mater Bristol Engl*. 2012;7:45012.

69. Luckprom P, Wongkhantee S, Yongchaitrakul T, Pavasant P. Adenosine triphosphate stimulates RANKL expression through P2Y1 receptor-cyclo-oxygenase-dependent pathway in human periodontal ligament cells. *Journal of periodontal research*. 2010;45(3):404-11.
70. Magni G, Ceruti S. The purinergic system and glial cells: emerging costars in nociception. *BioMed research international*. 2014;495789.
71. Manfredini D, Chiappe G, Bosco M. Research diagnostic criteria for temporomandibular disorders (RDC/TMD) axis I diagnoses in an Italian patient population. *J Oral Rehabil*. 2006;33:551-8.
72. Manfredini D, Guarda-Nardini L, Winocur E, Piccotti F, Ahlberg J, Lobbezoo F. Research diagnostic criteria for temporomandibular disorders: a systematic review of axis I epidemiologic findings. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2011;112(4):453-62.
73. Marcoline FV, Ishida Y, Mindell JA, Nayak S, Grabe M. A mathematical model of osteoclast acidification during bone resorption. *Bone*. 2016;93:167-80.
74. Matsuo K. Cross-talk among bone cells. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2009;18(4):292-7.
75. Merrild DM, Pirapaharan DC, Andreasen CM, Kjaersgaard-Andersen P, Moller AM, Ding M, et al. Pit- and trench-forming osteoclasts: a distinction that matters. *Bone research*. 2015;3:15032.
76. Miyazaki T, Iwasawa M, Nakashima T, Mori S, Shigemoto K, Nakamura H, et al. Intracellular and extracellular ATP coordinately regulate the inverse correlation between osteoclast survival and bone resorption. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(45):37808-23.
77. Morrison MS, Turin L, King BF, Burnstock G, Arnett TR. ATP is a potent stimulator of the activation and formation of rodent osteoclast. *Journal of Physiology* 1988;511(2):495—500.
78. Neutzsky-Wulff AV, Sørensen MG, Kocijancic D, Leeming DJ, Dziegiel MH, Karsdal MA, Henriksen K. Alterations in osteoclast function and phenotype induced by different inhibitors of bone resorption implications for osteoclast quality. *BMC Musculoskelet Disord*. 2010;11:109.
79. North R. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev*. 2002;82(4):1013-67.
80. North RA, Jarvis MF. P2X receptors as drug targets. *Molecular pharmacology*. 2013;83(4):759-69.



81. Orriss IR, Burnstock G, Arnett TR. Purinergic signalling and bone remodelling. *Current opinion in pharmacology*. 2010;10(3):322-30.
82. Orriss IR, Key ML, Brandao-Burch A, Patel JJ, Burnstock G, Arnett TR. The regulation of osteoblast function and bone mineralisation by extracellular nucleotides: The role of p2x receptors. *Bone*. 2012;51(3):389-400.
83. Orriss IR, Wang N, Burnstock G, Arnett TR, Gartland A, Robaye B, et al. The P2Y(6) receptor stimulates bone resorption by osteoclasts. *Endocrinology*. 2011;152(10):3706-16.
84. Pedersen B, Febbraio, MA. Muscle as an Endocrine Organ: Focus on Muscle-Derived Interleukin-6. *Physiological Reviews*. 2008;88(4):1379-406.
85. Pellegatti P, Falzoni S, Donvito G, Lemaire I, Di Virgilio F. P2X7 receptor drives osteoclast fusion by increasing the extracellular adenosine concentration. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2011;25(4):1264-74.
86. Pupo YM, Pantoja LL, Veiga FF, Stechman-Neto J, Zwir LF, Farago PV, et al. Diagnostic validity of clinical protocols to assess temporomandibular disk displacement disorders: a meta-analysis. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*. 2016;122(5):572-86.
87. Ramos-Junior ES, Morandini AC, Almeida-da-Silva CL, Franco EJ, Potempa J, Nguyen KA, et al. A Dual Role for P2X7 Receptor during *Porphyromonas gingivalis* Infection. *Journal of dental research*. 2015;94(9):1233-42.
88. Reyes JP, Sims SM, Dixon SJ. P2 receptor expression, signaling and function in osteoclasts. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2011;1(3):1101-18.
89. Rochefort GY, Benhamou CL. Osteocytes are not only mechanoreceptive cells. *International journal for numerical methods in biomedical engineering*. 2013;29(10):1082-8.
90. Rumney RM, Wang N, Agrawal A, Gartland A. Purinergic signalling in bone. *Frontiers in endocrinology*. 2012;3:116.
91. Saarto T, Sievanen H, Kellokumpu-Lehtinen P, Nikander R, Vehmanen L, Huovinen R, et al. Effect of supervised and home exercise training on bone mineral density among breast cancer patients. A 12-month randomised controlled trial. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2012;23(5):1601-12.

92. Schwiebert EM, Zsembery A. Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*.2003;1615(1-2), 7-32.
93. Shao J, Wang Z, Yang T, Ying H, Zhang Y, Liu S. Bone Regulates Glucose Metabolism as an Endocrine Organ through Osteocalcin. *International journal of endocrinology*. 2015:967673.
94. Schiffman E, Ohrbach R, Truelove E, Look J, Anderson G, Goulet JP, et al. Diagnostic Criteria for Temporomandibular Disorders (DC/TMD) for Clinical and Research Applications: recommendations of the International RDC/TMD Consortium Network\* and Orofacial Pain Special Interest Groupdagger. *Journal of oral & facial pain and headache*. 2014;28(1):6-27.
95. Silinsky EM. On the association between transmitter secretion and the release of adenine nucleotides from mammalian motor nerve terminals. *J Physiol*. 1975; 247(1): 145–162.
96. Sims NA, Gooi JH. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Seminars in cell & developmental biology*. 2008;19(5):444-51.
97. Sims NA, Martin TJ. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *BoneKEy Rep*. 2014;3.
98. Sims NA, Vrahnas C. Regulation of cortical and trabecular bone mass by communication between osteoblasts, osteocytes and osteoclasts. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2014;561:22-8.
99. Soysa NS, Alles AN, Aoki K, Ohya K. Osteoclast formation and differentiation: An overview. *Journal of medical and dental sciences*. 2012;59((3)):65-74
100. Takahashi K, Matsuda Y, Naruse K. Mechanosensitive ion channels. *AIMS Biophysics*. 2016;3(1), 63-74.
101. Taylor AF, Saunders MM, Shingle DL, Cimbala JM, Zhou Z, Donahue HJ. Mechanically stimulated osteocytes regulate osteoblastic activity via gap junctions. *American journal of physiology Cell physiology*. 2007;292(1):C545-52.
102. Valladares D, Almarza G, Contreras A, Pavez M, Buvinic S, Jaimovich E, et al. Electrical stimuli are anti-apoptotic in skeletal muscle via extracellular ATP. Alteration of this signal in Mdx mice is a likely cause of dystrophy. *PloS one*. 2013;8(11):e75340.
103. Voegeli AV et al. *Lecciones básicas de biomecánica del aparato locomotor*. Springer. 2004;Madrid.

104. Wang N, Rumney RM, Yang L, Robaye B, Boeynaems JM, Skerry TM, et al. The P2Y<sub>13</sub> receptor regulates extracellular ATP metabolism and the osteogenic response to mechanical loading. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2013;28(6):1446-56.
105. Weilbaecher KN, Guise TA, McCauley LK. Cancer to bone: a fatal attraction. *Nature reviews Cancer*. 2011;11(6):411-425.
106. Wesselius A, Bours MJ, Henriksen Z, Syberg S, Petersen S, Schwarz P, et al. Association of P2Y<sub>2</sub> receptor SNPs with bone mineral density and osteoporosis risk in a cohort of Dutch fracture patients. *Purinergic signalling*. 2013;9(1):41-9.
107. Xiong J, Piemontese M, Onal M, Campbell J, Goellner JJ, Dusevich V, et al. Osteocytes, not Osteoblasts or Lining Cells, are the Main Source of the RANKL Required for Osteoclast Formation in Remodeling Bone. *PloS one*. 2015;10(9):e0138189.

### **XIII. ANEXOS.**

Certificado de Bioseguridad

Comité Institucional de Bioseguridad  
Administración Conjunta Campus Norte  
FDO N°61

Santiago, 26 de Mayo de 2015.

**C E R T I F I C A D O**

El Comité Institucional de Bioseguridad (CIB) ha analizado el Proyecto de Investigación Fondecyt Regular N°1151353, 2015 titulado “**Unveiling molecular basis for muscle remodeling and muscle-bone crosstalk at the masticatory apparatus: extracellular ATP as a signaling molecule**”. El Investigador Responsable de este proyecto es la Dra. Sonja Buvinic Radic, Académico del Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas, Facultad Odontología, Universidad de Chile.

Todos los ensayos propuestos a realizar, ya sea bioquímicos, moleculares y con los animales (ratones BalbC) se realizarán en el laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Odontología, cuyo personal técnico que colaborará y tesisistas, se encuentran debidamente entrenados en esta área. Además, ellos estarán bajo la supervisión de la Dra. Buvinic.

El CIB certifica que la Facultad mencionada anteriormente cuenta con las facilidades para el manejo y desecho del material químico, biológico y animales de experimentación a utilizar en el proyecto de acuerdo al Manual de Bioseguridad, Conicyt 2008. Además, el investigador se compromete a velar por el cumplimiento de las normas de bioseguridad, durante el desarrollo del proyecto.

Se extiende el presente certificado a solicitud de la Dra. Buvinic para ser presentado al Concurso Fondecyt Regular 2015.



**Dr. Mario Chiong**  
Secretario



*Carla Lozano*  
**Dra. Carla Lozano M.**  
Presidenta

Facultad de Odontología. Sergio Livingstone P. 943, Independencia, Fono 29781792-29781832, Fax: 29781748, Santiago.  
<http://odontologia.uchile.cl>

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Sergio Livingstone P. 1007, Independencia, Fono 29781792 Fax: 29781748, Santiago. <http://www.quimica.uchile.cl/>