

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSGRADO**



**ATP liberado por osteoclastos activa la síntesis proteica del músculo
esquelético a través de la vía PI3K/Akt/mTOR**

CAMILO MORALES JIMÉNEZ

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOMÉDICAS**

**DIRECTORES DE TESIS: Dra. Sonja Buvinic R.
Dr. Enrique Jaimovich P.**

2018

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO

INFORME DE APROBACION TESIS DE
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas presentada por el candidato

CAMILO MORALES JIMÉNEZ

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Doctor en Ciencias Biomédicas** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 26 de Julio del 2018.

Prof. Dra. Sonja Buvinic
Directora de Tesis
Instituto de Investigación en Cs. Odontológicas
Facultad de Odontología
Universidad de Chile

Prof. Dr. Enrique Jaimovich
Director de Tesis
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad Medicina
Universidad de Chile

COMISION INFORMANTE DE TESIS

PROF. DR. MAURICIO HENRÍQUEZ

PROF. DR. MARIO GALINDO

PROF. DR. HUGO OLGUÍN

PROF. DR. MANUEL ESTRADA
Presidente Comisión de Examen

ESTA TESIS ESTA DEDICADA:

A mi Mama y hermana

Por mostrarme que la vida se puede soñar, pero el trabajo es fundamental para conseguirlo.

A mi esposa

Por todo su apoyo, amor, comprensión, dedicación y buenos vinos que fueron fundamentales para que yo pudiera cumplir mi sueño con amor.

A mi Hija

Por tomar los cambios con alegría y buscándole siempre las cosas buenas, darme su ternura y su amor en mi vida.

AGRADECIMIENTOS:

Caminando nuevamente para el apartamento que nos acogió durante 4 años paso por cerro blanco, entré a la Geno y me como una rica chaparrita y mientras la degusto paso por la villita y veo la virgen en el cerro San Cristóbal y pienso lo agradecido que debo estar por estar acá, hace cinco años no imaginaba que pudiera estar en Chile, estar en esta hermosa ciudad y más aún, que podría estar estudiando en una de las mejores Universidades del mundo y poder haber cumplido mi sueño de hacer ciencia.

Recuerdo cuando me realizaron la entrevista desde Skype preguntándome porque quería estudiar Ciencias Básicas en la Universidad de Chile y yo dije que deseaba llegar a un país donde pudiera estudiar biología celular en músculo esquelético y ese sueño se cumplió completamente, era algo que sentía utópico, pero que acá se hizo realidad, y ese sueño lo logre gracias a los laboratorios del profesor Enrique Jaimovich y especialmente al laboratorio de la profesora Sonja Buvinic, que no solo me dio la oportunidad de trabajar en su laboratorio, sino además, me mostró que es ser una gran profesional, humilde, amorosa y que la ciencia es compatible con la familia.

Para mí, entrar al laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Odontología, es entrar a mi casa, a mi espacio, en donde están grandes seres humanos como lo son los profesores a los cuales respeto mucho porque son grandes seres humanos, los profesores Paula Lima, Vicente, Alfredo, Jano y José que hacen de este espacio un lugar único, con sus grandes grupos que, con sus temas diversos han sido parte importante en mi formación y son un gran ejemplo que la ciencia se puede construir colaborativamente, a todos ellos gracias.

A mis compañeros de laboratorio, Nadia, Manuel, Julián, Carolina, Pato que han hecho de este espacio un lugar inolvidable para mí, me encanta recordar las caras de sorpresas ante algún resultado inesperado, pensado en una posible hipótesis, soñando y dejándome soñar a mí de paso.

A mí soporte familiar, mi mamá, mi esposa e hija, que llenan de amor mi mundo y aunque no entiendan muchas de las cosas que estudio siempre me han apoyado con paciencia, amor, respeto y alegría, no pudiera estar aquí cumpliendo este sueño, si no hubiera estado en cada momento rodeados por ellas.

Por último, a la Universidad Javeriana Cali y a Conicyt, que hicieron posible que económicamente este proyecto de vida y reto personal se pudiera llevar a cabo.

*La ciencia es bella y es por esa belleza que debemos trabajar en ella,
y quizás, algún día, un descubrimiento científico como el radio,
puede llegar a beneficiar a toda la humanidad*

Marie Curie

Esta tesis fue financiada por los proyectos:

- FONDECYT 1151353

Camilo Morales Jiménez fue financiado por:

- Conicyt: Beca De Doctorado En Chile Para Extranjeros Sin Permanencia Definitiva En Chile, Año Académico 63140009.
- Pontificia Universidad Javeriana Cali: Formación De Profesores En Estudios De Doctorado. 2014.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. Introducción.....	5
1.1 Generalidades de la integración musculoesquelética.	5
1.2 Biología Ósea.....	5
1.3 Remodelación Ósea.....	7
1.4 Movimiento de líquido intersticial induce mecanotransducción en el hueso.	9
1.5 Comunicación paracrina hueso-músculo.	10
1.6 Secreción de moléculas por parte de las células óseas que pueden afectar la masa muscular.....	11
1.7 Generalidades de la señalización por nucleótidos extracelulares.....	12
1.8 Liberación de ATP al medio extracelular.....	13
1.9 Señalización purinérgica en el sistema óseo.	15
1.10 Liberación de ATP en células de remodelación ósea.	16
1.11 Generalidades de tejido muscular.....	18
1.12 Señales purinérgicas en el músculo esquelético.....	19
1.13 Efectos del ATP extracelular sobre la vía PI3K/Akt/mTOR.	20
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	23
2.1 Hipótesis.	23
2.2 OBJETIVOS.....	23
2.2.1 Objetivo General.....	23
2.2.2 Objetivos Específicos:.....	23
3. Materiales y Métodos.	24
3.1 Reactivos	24
3.2 Línea celular de monocitos de ratón RAW 264.7 (ATCC®TIB-71™).....	25
3.3 Extracción y cuantificación del ARN total:.....	26

3.4 Síntesis de cDNA por transcripción inversa:	26
3.5 PCR en tiempo real (qPCR):.....	26
3.6 Estímulos mecánicos:	27
3.7 Cuantificación de los niveles de ATP extracelular:.....	28
3.8 Cuantificación de actividad de Lactato deshidrogenasa (LDH):.....	28
3.9 Purificación de osteoclastos por gradientes de suero:.....	29
3.10 Citoquímica de TRAP.....	29
3.11 Determinación fenotípica de los cultivos celulares.....	30
3.12 Inmunofluorescencia.....	30
3.13 Disección de músculos FDB.	31
3.14 Inmunoblot.	31
3.15 Determinación de la síntesis de proteínas a través de la técnica SUnSET (<i>Surface Sensing of Translation</i>).....	32
3.16 Comunicación paracrina entre osteoclastos purificados y músculo FDB. .	32
3.17 Presentación de datos y Análisis Estadístico.....	33
4. RESULTADOS	34
4.1 Estimulación mecánica de osteoclastos en cultivo induce salida de ATP al medio extracelular. Caracterización del modelo celular y de las vías de liberación.	34
4.1.1 RANKL genera la diferenciación de monocitos a osteoclastos.....	34
4.1.2 Estímulo mecánico promueve liberación de ATP de células RAW monocitos y RAW 5d RANKL.	35
4.1.3 Bloqueadores de la vía conductiva (receptor P2X ₇ , panexina/conexina) inhiben la liberación de ATP inducida por estímulo mecánico en células RAW monocitos y RAW 5d RANKL.	36
4.1.4 Los cultivos RAW 5d RANKL presenta un 20% de marca TRAP+ y una alta proporción de células mononucleadas.....	38
4.1.5 Utilización de una técnica de gradiente de suero para separar los osteoclastos de las células mononucleadas en cultivos RAW 5d RANKL.	42

4.1.6 Osteoclastos purificados expresan panexina 1 y receptores P2X ₇ y presentan vesículas que contienen ATP.....	44
4.1.7 Osteoclastos purificados liberan ATP basalmente y por estímulo mecánico a través de rutas independientes.....	45
4.1.8 Osteoclastos purificados presentan mayor liberación basal de ATP y menor post movimiento del medio que cultivos celulares RAW monocito y RAW 5d RANKL.....	47
4.2 ATP extracelular induce la síntesis de proteínas en músculo FDB de ratón por activación de receptores P2Y asociados a la vía PI3K-Akt-mTOR.	49
4.2.1 ATP 100 µM fosforila Akt en S473 en músculo completo y S6 en S(235/236). Curva de tiempo.....	49
4.2.2 ATP promueve la fosforilación de Akt en S473 de manera concentración-dependiente y activa los componentes de la vía mTOR, p70S6K y 4E-BP1 en músculo FDB aislado.....	50
4.2.3 ATP incrementa la síntesis de proteínas en el músculo FDB.	52
4.2.4 El Incremento en la síntesis de proteínas en músculo FDB inducido por ATP 3 µM es dependiente de la vía P2-PI3K-mTOR.....	53
4.2.5 ATP 3µM no afecta la vía de degradación de proteínas vía poli-ubiquitina.	55
4.3 Osteoclastos estimulados mecánicamente promueven la síntesis de proteínas en músculo esquelético a través de la liberación de ATP y activación de la vía P2Y-PI3K-Akt-mTOR.	56
4.3.1 Osteoclastos purificados liberan ATP en concentraciones cercanas a 3 µM.....	56
4.3.2 En un sistema de co-cultivo, el estímulo mecánico de osteoclastos purificados incrementa la síntesis de proteínas en músculo esquelético.....	57
4.3.3 La síntesis de proteínas en el músculo FDB inducida por estimulación mecánica de osteoclastos es dependiente de ATP extracelular.....	59
4.3.4 La síntesis de proteínas en músculo FDB inducida por estimulación mecánica de osteoclastos es dependiente de la activación de la vía P2R-PI3K-mTOR.....	60

5. DISCUSIÓN.....	62
5.1 La estimulación mecánica promueve la salida de ATP desde osteoclastos.....	62
5.2 ATP extracelular promueve la síntesis de proteínas en músculo esquelético por activación de la vía P2Y-PI3K-Akt-mTOR.....	65
5.3 ATP liberado por osteoclastos aumenta de manera paracrina la síntesis de proteínas en músculo FDB de ratón.....	68
6. CONCLUSIONES.....	74
7. PROYECCIONES	75
8. Referencias	76
Anexo	83

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Estructura y composición de los huesos.
- Figura 2.** Proceso de remodelación ósea.
- Figura 3.** Las cargas mecánicas del hueso.
- Figura 4.** Mecanismos de liberación de nucleótidos al medio extracelular.
- Figura 5.** Fenotipo óseo de ratones KO de P2Y1, P2Y2 o P2Y6.
- Figura 6.** Modelo de liberación de ATP post estímulo mecánico.
- Figura 7.** Esquema del efecto del ATP extracelular sobre la vía P2Y/PI3K/Akt /mTOR.
- Figura 8.** RANKL promueve la diferenciación de monocitos a osteoclastos.
- Figura 9.** Estímulo mecánico induce liberación de ATP desde células RAW monocitos y RAW 5d RANKL.
- Figura 10.** Estrategias farmacológicas de bloqueo de la liberación de ATP por vía conductiva o vía vesicular.
- Figura 11.** Bloqueadores de la vía conductiva (receptor P2X₇, panexina/conexina) inhiben la liberación de ATP inducida por estímulo mecánico en células RAW monocitos y RAW 5d RANKL.
- Figura 12.** Expresión de TRAP analizada por citoquímica en células RAW monocitos o RAW 5d RANKL.
- Figura 13.** Cuantificación de la marca total de células TRAP⁺ en cultivos RAW 5-7d RANKL.
- Figura 14.** Caracterización de los cultivos RAW monocitos y RAW 5d RANKL a través de citometría de flujo.
- Figura 15.** Purificación de osteoclastos por gradiente de suero.
- Figura 16.** Inmunofluorescencia de los componentes de liberación de ATP en osteoclastos purificados.
- Figura 17.** Osteoclastos purificados liberan ATP basalmente y por estímulo mecánico a través de rutas independientes.
- Figura 18.** Osteoclastos purificados presentan mayor liberación basal de ATP y menor post movimiento del medio que cultivos celulares RAW monocito y RAW 5d RANKL.
- Figura 19.** ATP 100 μ M fosforila a Akt en S473 y a S6 en S(235/236) en músculo completo.

Figura 20. ATP promueve la activación de Akt de manera concentración-dependiente, y activa la ruta mTOR, p70S6K, 4E-BP1 en músculo FDB.

Figura 21. ATP incrementa la síntesis de proteínas en el músculo FDB.

Figura 22. La síntesis de proteínas inducida por ATP 3 μ M en músculo FDB es dependiente de la vía P2-PI3K-mTOR.

Figura 23. ATP 3 μ M no afecta la vía de degradación de proteínas vía poli-ubiquitina.

Figura 24. Los osteoclastos purificados presentan aumentos de las concentraciones extracelulares de ATP en el compartimento superior post estímulo mecánico.

Figura 25. El estímulo mecánico en osteoclastos purificados incrementa la síntesis de proteínas en el músculo esquelético adyacente.

Figura 26. La síntesis de proteínas en el músculo FDB inducida por estimulación mecánica de osteoclastos es dependiente de ATP extracelular.

Figura 27. La síntesis de proteínas en músculo FDB inducida por estimulación mecánica de osteoclastos es dependiente de la activación de la vía P2R-PI3K-mTOR.

Figura 28. Modelo de comunicación paracrina entre osteoclastos purificados y músculo FDB a través de ATP extracelular.

LISTA DE ABREVIATURAS

AC: Anhidrasa Carbónica

ADP: Adenosina 5'-difosfato

Akt/PKB: Proteína quinasa B serina/treonina quinasa

AMPK: Proteína quinasa activada por AMP

ATP: Adenosina 5'-trifosfato

Ca²⁺: Ion calcio.

CREB: Elemento de unión en respuesta a cAMP

Cnx: Conexina

FDB: Flexor corto de los dedos (*flexor digitorum brevis*)

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

IGF-1: Factor de crecimiento parecido a la insulina-1

MMP9: Metaloproteasa 9

mTOR: Blanco de la rapamicina de mamíferos

mTORC1: Complejo 1 de mTOR

mTORC2: Complejo 2 de mTOR

Pnx1: Panexina 1

Pnx3: Panexina 3

PI3K: Fosfatidilinositol 3 quinasa

Raptor: Proteína regulatoria asociada a mTOR

RANKL: Receptor activador del ligando del factor nuclear kappa-B

ARNm: ARN mensajero

rpS6: Proteína ribosomal S6

S6K1: Quinasa 1 de la proteína S6

TRAP: Fosfatasa ácida resistente de tartrato.

T: Treonina

TSC: Complejo de esclerosis tuberosa 1 y 2

UDP: Uridina 5'-difosfato

UTP: Uridina 5'-trifosfato

VNUT: Transportador de nucleótidos vesicular

4E-BP1: Proteína de unión 1 al factor de iniciación 4E

RESUMEN

Huesos y músculos son órganos integrados en la locomoción y el crecimiento; el compromiso de uno de ellos puede afectar la estructura y función del otro. Pérdidas o aumentos simultáneos de la masa ósea y muscular se observan en múltiples situaciones fisiopatológicas. En los últimos años, se ha desarrollado el concepto que, adicionalmente a la comunicación mecánica entre huesos y músculos, existe una comunicación bioquímica a través de moléculas solubles que actuarían de manera paracrina. Se ha demostrado que tanto las células de remodelación ósea (osteoblastos, osteoclastos y osteocitos) como las células musculares esqueléticas, tienen receptores para ATP extracelular de tipo P2X/P2Y, que regulan su diferenciación y funcionalidad. Además, se ha demostrado que tanto osteoblastos como osteocitos liberan ATP al medio extracelular tanto basalmente como por estímulos mecánicos. Se desconoce si este efecto también ocurre en osteoclastos.

En los últimos años nuestro grupo ha demostrado la acción del ATP extracelular en el músculo esquelético, donde es liberado durante la actividad muscular y actúa de manera autocrina regulando la expresión de genes que controla la plasticidad muscular. Teniendo en cuenta que: 1) Existe una relación entre la masa ósea y la masa muscular, que se ve afectada por aumento y disminución de la carga mecánica; 2) El estímulo mecánico aumenta la liberación de ATP desde osteoblastos y osteocitos; 3) El músculo esquelético expresa receptores purinérgicos que regulan la expresión de genes; 4) En otros tipos celulares se ha demostrado que ATP extracelular activa la vía PI3K-Akt-mTOR, con efectos en el crecimiento, supervivencia y proliferación celular; 5) La vía PI3K-Akt-mTOR es importante en la regulación de la síntesis de proteínas en músculo esquelético, en este trabajo se puso a prueba la siguiente hipótesis:

“Osteoclastos liberan ATP al medio extracelular por estímulos mecánicos y aumentan la síntesis de proteínas en músculo esquelético a través de la activación de receptores P2 asociados a la vía PI3K-Akt-mTOR”.

En esta tesis demostramos que osteoclastos purificados a partir de la línea celular RAW264,7 diferenciada en presencia de RANKL, liberan ATP al medio extracelular

tanto basalmente como en respuesta a estimulación mecánica por movimiento del medio. La liberación de ATP es proporcional a la intensidad del estímulo, e independiente de la lisis celular. La liberación de ATP basal ocurre tanto por vía vesicular como por vía conductiva a través de hemicanales de panexina 1. La liberación de ATP inducida por estímulo mecánico ocurre por vía conductiva, mediada por receptores P2X₇.

Paralelamente, demostramos que el ATP exógeno promueve la fosforilación de Akt (S473) en músculo FDB aislado de ratones adultos, de manera tiempo- y concentración-dependiente, con máximos a los 7-15 min y 3 μ M de concentración. ATP 3 μ M indujo fosforilación de las proteínas río debajo de Akt: mTOR (S2448), p70S6K (T389) y 4E-BP1 (T37/46). ATP 3 μ M aumentó 1,41 veces la tasa de síntesis de proteínas en músculo FDB; este efecto fue bloqueado con suramina (antagonista general P2X/P2Y), LY294002 (inhibidor de fosfatidilinositol 3 quinasa) y rapamicina (inhibidor de mTOR).

Finalmente, en cocultivos en cámaras Transwell®, demostramos que osteoclastos estimulados mecánicamente promueven la síntesis de proteínas en músculo FDB aislado, a través de un mecanismo dependiente de la liberación de ATP y activación de la vía P2-PI3K-Akt-mTOR en las células musculares.

Considerando los resultados de este trabajo quedan varias propuestas de futuros trabajos de investigación como: 1) La liberación de ATP por los osteoclastos podría promover la liberación de otras moléculas (osteoquinas), de mayor vida media o potencia, que tengan efecto inductor de la masa muscular; 2) El ATP liberado por los osteoclastos podría ejercer un efecto autocrino modificando su función durante estimulación mecánica afectando la remodelación ósea y sincronizando esta señal con procesos de remodelación muscular. Pero, además, abren una nueva área de interés clínico en patologías óseas y musculares en las cuales se ven afectadas sus masas, en condiciones como la pérdida de masa musculoesquelética durante el envejecimiento (osteoporosis/sarcopenia), o en procesos adaptativos relacionados con el uso/desuso muscular en las cuales moléculas liberadas por ambas estructuras pudieran llegar a afectar todos estos procesos.

ABSTRACT

Bones and muscles are integrated tissues involved in locomotion and growth; the dysfunction of one of them can affect the structure and function of the other. Losses or simultaneous increases in bone and muscle mass are observed in multiple pathophysiological situations. In recent years a new concept emerges which considers that, in addition to the mechanical communication between bones and muscles, there is a biochemical crosstalk through soluble molecules acting in a paracrine manner.

It has been demonstrated that bone cells (osteoblasts, osteoclasts and osteocytes) and skeletal muscle cells have P2X/P2Y receptors for extracellular ATP, which regulate their differentiation and functionality. In addition, it has been reported that both osteoblasts and osteocytes release ATP to the extracellular medium both basally and by mechanical stimulation. It is unknown if this effect also occurs in osteoclasts.

In recent years, our group has demonstrated the role of extracellular ATP in skeletal muscle, where it is released during muscle activity and acts in an autocrine manner regulating gene expression that controls muscle plasticity.

Taking into account that: 1) There is a relationship between bone mass and muscle mass, which is affected by increase and decrease of the mechanical loading; 2) Mechanical stimulation increases ATP release from osteoblasts and osteocytes; 3) Skeletal muscle expresses purinergic receptors that regulate gene expression; 4) In other cell types it has been shown that extracellular ATP activates the PI3K-Akt-mTOR pathway, with effects on cell growth, survival and proliferation; 5) The PI3K-Akt-mTOR pathway is relevant for regulating protein synthesis in skeletal muscle; in this work the following hypothesis was tested:

"Osteoclasts release ATP to the extracellular medium by mechanical stimuli and increase protein synthesis in skeletal muscle through the activation of P2Y receptors associated with the PI3K-Akt-mTOR pathway".

In this thesis we demonstrated that osteoclasts, purified from the RAW264.7 cell line differentiated by RANKL, release ATP to the extracellular medium both basally and in response to mechanical stimulation by medium perturbation. The ATP release is proportional to the intensity of the stimulus and independent of cell lysis. The basal release of ATP occurs both via vesicular exocytosis and via conductive mechanisms through pannexin 1 hemichannels. The ATP release evoked by mechanical stimulation occurs via a conductive mechanism mediated by P2X₇ receptors.

In parallel, we demonstrated that exogenous ATP promotes Akt phosphorylation (S473) in FDB muscle isolated from adult mice, in a time- and concentration-dependent manner, with maximal values at 7-15 min and 3 μ M. ATP also induced phosphorylation of proteins downstream Akt: mTOR (S2448), p70S6K (T389) and 4E-BP1 (T37 / 46). ATP 3 μ M increased the protein synthesis rate in FDB muscle by 2.2 times; this effect was blocked with suramin (general P2X / P2Y antagonist), LY294002 (phosphatidylinositol 3 kinase inhibitor) and rapamycin (mTOR inhibitor). ATP 3 μ M did not significantly modify the activity of the degradation pathway that involves ubiquitin 3 ligase-proteasome.

Finally, using co-cultures in Transwell® chambers, we demonstrated that mechanically stimulated osteoclasts promote protein synthesis in isolated FDB muscle, through a mechanism dependent on the ATP release and activation of the P2-PI3K-Akt-mTOR pathway in muscle cells.

Considering that ATP is a ubiquitous molecule, released by multiple cell types at the musculoskeletal system (muscle fibers, bone cells, blood vessel cells, connective tissue fibroblasts), it could participate in the fine regulation of muscle mass. These evidences open a new area of clinical interest in bone and muscle pathologies, in conditions such as the loss of musculoskeletal mass during aging (osteoporosis / sarcopenia), or in adaptive processes related to muscle use/disuse. In addition to its clinical relevance, knowing the processes that control the homeostasis of the musculoskeletal system is an attractive target in the field of exercise physiology and high-performance training.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Generalidades de la integración musculoesquelética.

El hueso y el músculo son órganos integrados en la locomoción y el crecimiento, pero además presentan relaciones cercanas en las que el compromiso de uno de ellos puede afectar la estructura y la función del otro. La relación del sistema musculoesquelético ha tomado gran importancia en numerosos ensayos clínicos, en los que se han relacionado de forma positiva la masa muscular con la masa ósea (Bajaj et al., 2015; Kaji, 2014; Laurent et al., 2016; Maurel, Jahn, & Lara-Castillo, 2017). Aumentos y disminuciones de la masa ósea y la masa muscular se han reportado durante todo el ciclo de vida (Burr, 1997; Maurel et al., 2017; Novotny, Warren, & Hamrick, 2015). Estos cambios en la masa ósea y muscular se han explicado en parte por las funciones comunes que comparten, de dar soporte y movimiento, lo que los lleva a un aumento en su masa a través del aumento de su función (Novotny et al., 2015; Sun et al., 2013). Esta teoría mecano-funcional ha sido fuertemente respaldada en diferentes ensayos clínicos, en los que evidencian disminuciones simultáneas de la masa ósea y muscular, con disminución de la actividad musculoesquelética, como en el caso de enfermedad obstructiva crónica, falla cardíaca, lesiones neuronales que llevan a parálisis, distrofias neuromusculares, inmovilizaciones con yeso, microgravedad y reposo prolongado (Brotto & Bonewald, 2015; Laurent et al., 2016; Perrini et al., 2010; Thompson, Rubin, & Rubin, 2012). Además, de la teoría funcional se ha evidenciado que múltiples factores endocrinos disminuyen la masa de ambas estructuras como han sido el uso excesivo de glucocorticoides, el déficit de hormona de crecimiento (HG)/IGF-1 y el déficit de esteroides sexuales (Kaji, 2014; Laurent et al., 2016; Perrini et al., 2010; Thompson et al., 2012).

1.2 Biología Ósea.

El hueso es un tejido dinámico en constante remodelación. A pesar de las diferencias morfológicas, los huesos cumplen funciones similares, tales como ser una reserva de energía (tejido adiposo) y minerales (calcio y fósforo) (Kwan, 2015), y como centro primario de hematopoyesis (formación y maduración de elementos celulares de la sangre) en el individuo adulto al contener en su interior la médula ósea (Morrison & Scadden, 2014). En general, el hueso es un tejido organizado

jerárquicamente (Kwan, 2015; Oftadeh et al., 2015). A nivel nanométrico, el hueso está compuesto por una fase orgánica de proteínas no colágenas (como la osteopontina y la sialoproteína ósea (Bouleftour et al., 2016; Malaval et al., 2008) y el colágeno tipo I (Garnero, 2015; Viguet-Carrin, Garnero, & Delmas, 2006), y una fase inorgánica de cristales de apatita carbonatada con alto contenido de calcio y fósforo. Mediante la densidad mineral ósea se cuantifica el contenido mineral del hueso en g/cm³ (Oftadeh et al., 2015). En la escala micrométrica (Oftadeh et al., 2015), el hueso denominado “cortical” es aquel con un contenido mineral del 70%, organizado en láminas concéntricas que rodean paquetes vasculo-nerviosos (osteonas), y atravesado por canales transversales (canales de Volkmann) y canalículos irregulares (Figura 1).

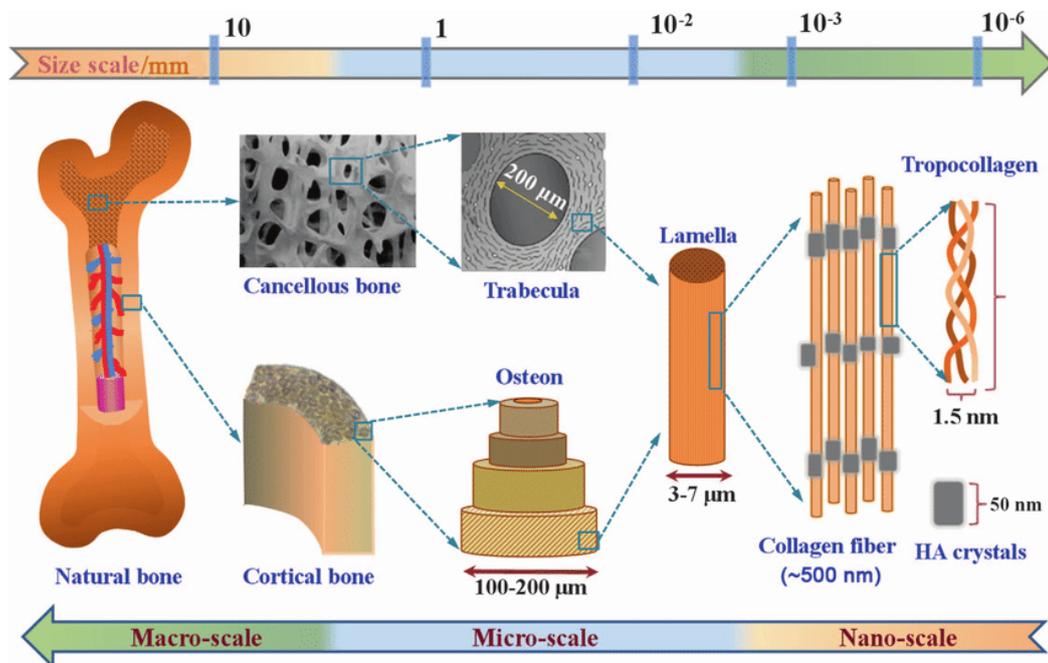


Figura 1. Estructura y composición de los huesos (Gao, Peng, Feng, & Shuai, 2017)

Por su parte, el hueso “trabecular” presenta menos contenido mineral (62 %), y una estructura laminada irregular del tejido óseo que forma columnas denominadas trabéculas distribuidas estratégicamente con base en la necesidad funcional del hueso. En general, en un nivel macroscópico el hueso cortical es menos poroso que el hueso trabecular (Bagi, Berryman, & Moalli, 2011), y está recubierto por tejido conectivo en la superficie denominado periostio (Evans et al., 2013; Lai, Price, Lu, & Wang, 2014) y en su interior denominado endostio. Además, el endostio recubre el hueso trabecular, pues este se encuentra en contacto directo con la

médula ósea en el interior, tejido blando altamente vascularizado e innervado, con una población de células precursoras mesenquimales y hematopoyéticas (Morrison & Scadden, 2014). Las células de origen mesenquimal y hematopoyético contribuyen a la capacidad de adaptación del hueso ante diferentes estímulos funcionales, pues integran los componentes del sistema óseo mediante el control de la remodelación ósea (Anderson, Renaud, & Rayfield, 2014).

1.3 Remodelación Ósea

La remodelación ósea se define como el recambio del hueso en el organismo maduro en el periodo postnatal, y se inicia por la resorción ósea local del tejido a reemplazar (Sims & Martin, 2014). Los osteoclastos del prefijo “osteo”-(hueso)- y el sufijo “clasto”-(destructor), son las células de origen hematopoyético especializadas en la resorción ósea (Cappariello, Maurizi, Veeriah, & Teti, 2014). Para ejecutar su función, los monocitos son atraídos hacia el área a remodelar mediante diversas señales moleculares, como el factor estimulante de formación de colonias de macrófagos (MCS-F) (Xiao, Wang, Pacios, Li, & Graves, 2016), y mediante la acción local del ligando del receptor activador del factor nuclear NF- κ B (RANKL) (Takahashi, Udagawa, & Suda, 1999; Walsh & Choi, 2014). En el sitio de acción, estos monocitos se diferencian en pro-osteoclastos y luego a pre-osteoclastos, para finalmente fusionarse y convertirse en osteoclastos multinucleados funcionales como se observa en la figura 2 (Boyle, Simonet, & Lacey, 2003; Xiao et al., 2016). Para ejecutar su principal función, el osteoclasto forma un anillo periférico y hermético en la zona del hueso a degradar, y mediante una bomba activa de protones genera un ambiente ácido (Cappariello et al., 2014). Este pH ácido permite la liberación de materiales inorgánicos como el calcio y el fósforo desde la superficie ósea, y es necesario para la actividad proteolítica de catepsina K, una enzima expresada principalmente por los osteoclastos que degrada el colágeno tipo I (Novinec & Lenarcic, 2013; Wen, Yi, Liu, Wei, & Xue, 2016). La degradación del colágeno tipo I genera el telopéptido carboxi-terminal del colágeno tipo I (CTX-I), y la concentración de este péptido es utilizada como biomarcador sistémico de resorción ósea (Cavalier et al., 2016; Chubb, 2012; Naylor & Eastell, 2012). Así mismo, junto a la catepsina K, el osteoclasto expresa proteínas como la Fosfatasa Ácida Resistente a Tartrato 5b (TRAP5b) (Lv et al., 2015), necesaria para controlar

su avance sobre el hueso (Ek-Rylander & Andersson, 2010), y utilizadas frecuentemente como marcadores moleculares de los osteoclastos (Lv et al., 2015; Novinec & Lenarcic, 2013). Después de la resorción local ósea producida por los osteoclastos, la formación de nuevo hueso es función de células derivadas de los precursores mesenquimales en la médula ósea, los osteoblastos (Long, 2011). Los osteoblastos forman tejido óseo, y al finalizar su función, pueden quedar atrapados en la matriz mineralizada, diferenciándose en osteocitos (Bonewald, 2011; Plotkin & Bellido, 2016). Los osteocitos representan más del 95 % de las células óseas (Plotkin & Bellido, 2016), (Kwan, 2015), mantienen una alta capacidad de comunicación mediante proyecciones dendríticas que recorren los canalículos de la matriz mineralizada (Honma et al., 2013; Plotkin & Bellido, 2016), y son considerados los principales mecanosensores del hueso (Kringelbach et al., 2015; Plotkin & Bellido, 2016). Además, son la mayor fuente de RANKL en el hueso trabecular (Honma et al., 2013; Xiong et al., 2015) y expresan moléculas específicas que permiten su identificación (como E11/gp38/podoplanina y DMP1). La disminución de la densidad mineral ósea por debajo de parámetros establecidos se conoce como osteopenia del sufijo “penia”, pérdida. Esta condición precede la osteoporosis, la cual compromete adicionalmente la estructura trabecular, y por lo tanto la calidad del hueso. Teniendo en cuenta que el RANKL es necesario para la proliferación y diferenciación de los osteoclastos proceso denominado osteoclastogénesis, la producción de RANKL y de su antagonista soluble, la osteoprotegerina (OPG), por parte de osteoblastos y osteocitos determina la razón RANKL/OPG (Walsh & Choi, 2014), y por lo tanto el balance en el recambio óseo (Humphrey & Nakamura, 2016; Kim & Kim, 2016; Takahashi et al., 1999; Takayanagi, 2009; Walsh & Choi, 2014).

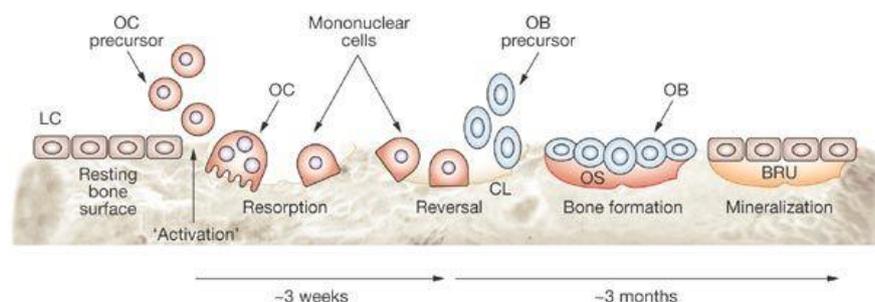


Figura 2. Proceso de remodelación ósea. La remodelación se inicia cuando se activan los osteoclastos, se resorbe el hueso y se crean cavidades de resorción. La resorción es seguida por la activación de osteoblastos y la formación de osteoide, que luego llena la cavidad. BRU, unidad de remodelación ósea; CL, línea de cemento; LC, células de revestimiento; OB, osteoblasto; OC, osteoclasto; OS, osteoide (Deal, 2009).

1.4 Movimiento de líquido intersticial induce mecanotransducción en el hueso.

Las señales mecánicas en el hueso son fundamentales para la regulación de la masa ósea, se ha reportado que el ejercicio físico incrementa la masa ósea y la inmovilización produce disminución (Fritton & Weinbaum, 2009). El mecanismo por el cual las células óseas generan la transducción de las señales mecánicas aún se encuentra en estudio, pero un punto que ha cobrado importancia en la actualidad es el flujo intersticial (Fritton & Weinbaum, 2009). Los osteocitos que se encuentran en la matriz ósea se ubican en espacios denominados lagunas y sus prolongaciones celulares se conectan con otras células óseas. Entre la matriz ósea y estas prolongaciones hay un espacio denominado canalículo, que puede atravesar completamente el hueso desde la parte trabecular hasta la parte cortical. Esta red de poros se denomina sistema laguno-canalicular (figura 3). Un punto importante en los procesos de mecano-traducción a nivel de las células óseas es que este sistema laguno-canalicular está invadido de fluido intersticial, el cual rodea los osteocitos, osteoblastos y osteoclastos (Fritton & Weinbaum, 2009).

Para determinar si efectivamente se presentaba movimiento de fluido en esta red laguno-canalicular con y sin carga en tiempo real, se utilizó fluoresceína de sodio con una técnica que combina la recuperación de fluorescencia después de foto-blanqueado medido a través de microscopia confocal (L. Wang et al., 2005), Así se demostró que hay difusión de la fluoresceína en condiciones sin carga y que a través de ciclos de compresión del hueso el transporte de esta molécula se incrementa en un 31% siendo este experimento una evidencia directa que la carga induce movimiento del fluido en este sistema (Price, Zhou, Li, & Wang, 2011).

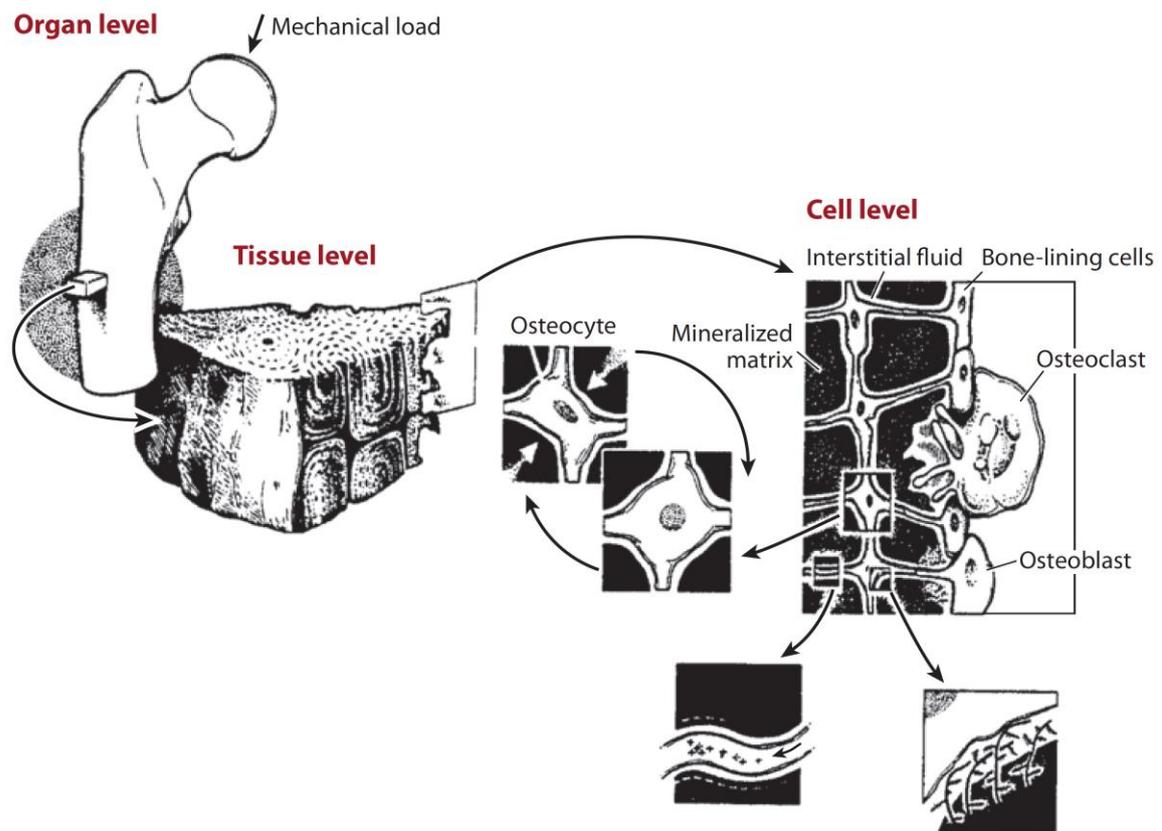


Figura 3. Las cargas mecánicas del hueso. La carga mecánica aplicada a nivel de todo el hueso se transmite a través del tejido óseo hasta el nivel celular y causa el movimiento del fluido intersticial que rodea a los osteocitos en la matriz mineralizada. (Fritton & Weinbaum, 2009; Rubin, McLeod, & Bain, 1990)

1.5 Comunicación paracrina hueso-músculo.

Un primer estudio que puso en evidencia la posible comunicación paracrina entre componentes del sistema musculoesquelético analizó la recuperación de la fractura de tibia en ratones cuando se implantaba sobre el periostio una membrana de nitrocelulosa de diferentes tamaños de poro (Kaufman, Reznick, Stein, Barak, & Maor, 2008). Esto restringía el paso de moléculas entre el músculo y el hueso, pero mantenía intacta la unión de ambos a través del tendón, para no alterar el efecto mecánico de la fuerza ejercida por el músculo. A través de evaluaciones radiográficas, se determinó que la tasa de síntesis y la calidad del hueso neoformado se correlacionaban directamente con el tamaño de poro de la membrana de nitrocelulosa, concluyendo que el contacto directo entre el hueso y el músculo son indispensables en la recuperación de la fractura (Kaufman et al., 2008). Esto llevó a pensar que dentro de esta unidad hueso-músculo existe una comunicación

bioquímica paracrina que es importante en la regulación de la estructura y la función.

Una pregunta importante que ha surgido en la actualidad es si los aumentos y las disminuciones de la actividad mecánica muscular y ósea presentan cambios en las liberaciones de “mioquinas (proteína que se produce y libera por las células musculares)” y “osteoquinas (proteína que se produce y libera por las células óseas)”, las que pueden impactar al tejido adyacente a través de la comunicación paracrina.

1.6 Secreción de moléculas por parte de las células óseas que pueden afectar la masa muscular.

En líneas celulares diferenciadas a osteoblastos y tipo-osteocitos se ha estudiado la secreción de moléculas denominadas osteoquinas por estimulaciones mecánicas como presión, estiramiento y flujo del medio extracelular (Cianferotti & Brandi, 2014). Un estudio realizado en la línea celular tipo-osteocitos MLO-Y4 demostró que los movimientos del medio extracelular de manera pulsátil promueven la secreción de factor de crecimiento similar a la insulina, factor de crecimiento mecánico, factor de crecimiento vascular endotelial y factor de crecimiento de hepatocitos. Estos factores tienen efecto anabólico en el músculo (Juffer, Jaspers, Lips, Bakker, & Klein-Nulend, 2012), por lo que han sido candidatos importantes en la comunicación bioquímica hueso-músculo (Brotto & Bonewald, 2015; Cianferotti & Brandi, 2014; Laurent et al., 2016; Tagliaferri, Wittrant, Davicco, Walrand, & Coxam, 2015).

En osteoblastos se ha descrito la producción de osteocalcina inducida por insulina; ésta, a su vez, cumple un papel paracrino y endocrino al regular la sensibilidad del músculo esquelético a la insulina (Zoch, Clemens, & Riddle, 2016). Como otras posibles moléculas de señalización liberadas por osteocitos y osteoblastos que podrían afectar la masa muscular se han propuesto prostaglandina E2 (PGE2), factor de crecimiento fibroblástico-23 y esclerostina, pero aún no hay suficiente información sobre su posible participación en la regulación de la masa muscular (Brotto & Bonewald, 2015; Cianferotti & Brandi, 2014; Kaji, 2014; Laurent et al., 2016; Tagliaferri et al., 2015).

Una molécula que también aumenta su liberación por estímulos mecánicos en los distintos tipos de células óseas (osteoblastos y osteocitos) es la adenosina 5'-trifosfato (ATP) (Rumney, Wang, Agrawal, & Gartland, 2012). Debido a su aumento en el medio extracelular durante la estimulación mecánica y la gran cantidad de receptores purinérgicos que presentan las diferentes células óseas, esta molécula se ha estudiado como reguladora del recambio óseo, ejerciendo acciones a través de rutas autocrinas y paracrinas en las células mecanosensoras óseas (osteocitos), en células formadoras de hueso (osteoblastos) y en las células que promueven resorción ósea (osteoclastos) (Rumney et al., 2012). Por lo anterior, ya en una revisión actual sobre candidatos en la comunicación hueso músculo se ha adicionado al ATP como un posible candidato liberado por células óseas que puede impactar al músculo (Brotto & Bonewald, 2015).

1.7 Generalidades de la señalización por nucleótidos extracelulares.

La señalización por ATP extracelular ha sido caracterizada por ser de las más primitivas y ubicuas de las comunicaciones intercelulares (Rumney et al., 2012). Esta comunicación está constituida por la molécula ATP y sus metabolitos, que activan receptores específicos de la membrana plasmática denominados "receptores de nucleótidos" y regulan múltiples procesos fisiológicos (Rumney et al., 2012). A diferencia de los receptores de nucleósidos P1, activados por adenosina, los receptores de nucleótidos P2 son activados diferencialmente por ATP, adenosina 5'-difosfato (ADP), uridina 5'-trifosfato (UTP) y/o uridina 5'-difosfato (UDP) (Burnstock, 2014). Los receptores P2, de acuerdo con sus características moleculares y mecanismos de señalización, se agrupan en dos familias, los receptores P2X (canales iónicos) y los receptores P2Y (receptores acoplados a proteína G). En la actualidad se han caracterizado cuatro subtipos de receptores P1 (A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃), siete subtipos de receptores P2X (1-7) y ocho subtipos de receptores P2Y (1,2,4,6,11-14) (Burnstock, Arnett, & Orriss, 2013). Dentro de las funciones que se han relacionado con los nucleótidos extracelulares están la comunicación neurona-glía, el reclutamiento de las células inmunes, la agregación plaquetaria, la regulación del tono vascular, la proliferación celular, entre muchas otras (Burnstock et al., 2013).

1.8 Liberación de ATP al medio extracelular.

La liberación de ATP desde diferentes tipos celulares se produce a nivel basal y en respuesta a varios estímulos tales como hipoxia, inflamación o estimulación mecánica (Corriden & Insel, 2010). Esta liberación de ATP al medio extracelular se debe principalmente a dos mecanismos, la liberación a través de vesículas y la liberación a través de canales o también denominado vía conductiva. La liberación por vía vesicular, la cual presenta dos formas, la liberación constitutiva (la cual podría explicar en parte la liberación basal de ATP) y la liberación por regulación exocítica, en la cual requiere de un transportador de ATP al interior de la vesícula (VNUT), pero además requiere de un incremento de calcio para su liberación como se observa en la figura 4 (Lazarowski, 2012).

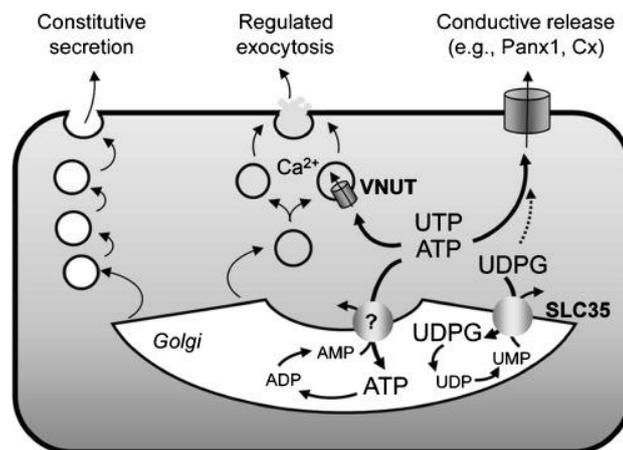


Figura 4. Mecanismos de liberación de nucleótidos al medio extracelular. En esta figura se muestra la secreción de ATP constitutiva, por vía vesicular (exocitosis) y por vía conductiva (mediada por canales iónicos). (Lazarowski, 2012).

Por su parte la liberación por vía conductiva se realiza a través de canales entre los cuales se encuentran panexinas, conexinas, receptor P2X₇ y canales de cloruro (Lazarowski, 2012). En los últimos años ha tomado importancia el rol del canal de panexina como mecanismo de salida del ATP desde la célula, al formar un canal mecánicamente sensible y permeable a ATP (Bao, Locovei, & Dahl, 2004; Penuela, Gehi, & Laird, 2013). La familia de proteínas conocidas como Panexinas está formada por tres miembros (Panx1, Panx2, Panx3) que forman canales en la membrana plasmática. De los miembros de esta familia, Panx1 presenta una expresión ubicua en muchos tejidos animales, mientras que Panx2 y Panx3 presentan una expresión más restringida (Penuela et al., 2013). La función de Panx1 como un canal liberador de ATP ha sido extensamente estudiada,

encontrando importantes hallazgos que otorgan a este canal un rol crucial en importantes procesos fisiopatológicos (Chekeni et al., 2010; Locovei, Wang, & Dahl, 2006; Penuela et al., 2013; Seminario-Vidal et al., 2011). Una característica importante del canal Panx1 es que puede abrirse por aumentos del calcio intracelular, facilitando así la rápida salida de ATP a través de la membrana (Bao et al., 2004; Locovei et al., 2006).

A nivel celular se ha estudiado que muchas células pueden presentar uno o varios mecanismos de liberación de ATP, como ejemplo tenemos las neuronas que al igual que los neurotransmisores el ATP es empaquetado en vesículas y liberado por vía exocítica como ocurre a través de la motoneurona (Silinsky & Redman, 1996), pero este mecanismo también se ha reportado en líneas celulares de osteoblastos (Genetos, Geist, Liu, Donahue, & Duncan, 2005; Romanello et al., 2005). En otros tipos celulares, como en los osteocitos se ha reportado que su liberación se da a través de una vía conductiva utilizando como vía la conexina 43 (Cnx-43) (Genetos, Kephart, Zhang, Yellowley, & Donahue, 2007) o en músculo esquelético en el cual se encontró que su principal vía de liberación es a través de Panx-1 (Buvinic et al., 2009).

Un factor importante en la señalización purinérgica es que las células presentan en su membrana externa enzimas que hidrolizan nucleótidos regulando las concentraciones de estos a nivel extracelular, regulando las señales purinérgicas (Zimmermann, Zebisch, & Strater, 2012). Estas enzimas denominadas ectonucleotidasas generan nucleósidos extracelulares para la recaptación celular a través de transportadores de nucleósidos de la membrana plasmática (Zimmermann et al., 2012). Estas enzimas se dividen en cuatro grupos que incluyen ecto-nucleosido trifosfato difosfodihidrolasas, ecto-5'-nucleotidasa, ecto-nucleotido pirofosfatasa/fosfodiesterasa y fosfatasas alcalinas, siendo esta última fundamental en el control de la mineralización ósea (Zimmermann et al., 2012).

Un factor relevante de la señalización purinérgica a nivel celular es que su acción es dependiente de las vías de liberación, pero además depende de la tasa de degradación mediado por las ectonucleotidasas, de la combinación de ambos más los receptores purinérgicos que exprese la célula será la relevancia de las señales

purinérgicas, demostrando todo esto la diversidad de funciones fisiológicas que puede tener este sistema.

1.9 Señalización purinérgica en el sistema óseo.

Las señales purinérgicas en el hueso fueron descritas con las observaciones que el ATP extracelular provocaba señales de calcio y activación de segundos mensajeros en osteoblastos, con implicancia en su funcionalidad (Rumney et al., 2012). Estudios iniciales en cultivos celulares de osteoblastos de rata encontraron que ATP y UTP activan los receptores P2Y₂ inhiben la formación de hueso disminuyendo la mineralización de la matriz orgánica y la expresión y actividad de la fosfatasa alcalina (Orriss, 2015). Estudios en ratones *knockout* de receptores P2Y₁, P2Y₂ o P2Y₆ han mostrado cambios en el número y volumen trabecular, como cambios en el grosor del hueso cortical como se observa en la figura 5, mostrando la importancia de las señales purinérgicas en el sistema óseo.

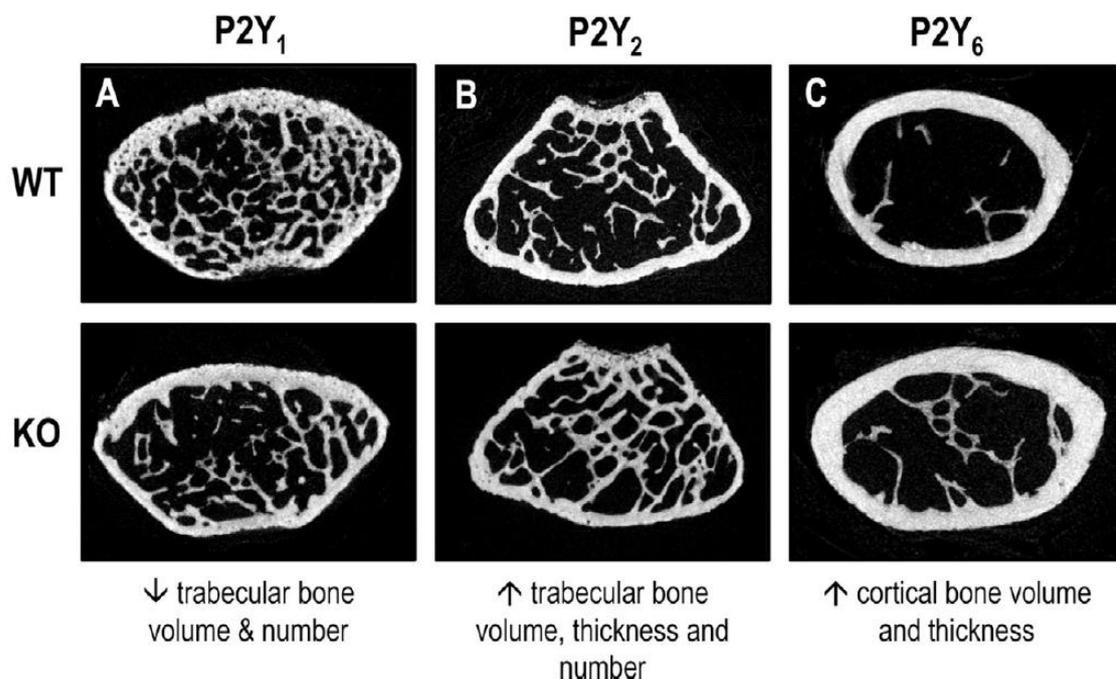


Figura 5. Fenotipo óseo de ratones KO de P2Y₁, P2Y₂ o P2Y₆ (Orriss, 2015).

Movimientos del medio extracelular en las líneas celulares tipo osteoblasto MC3T3-E1 osteoblastos y tipo osteocito MLO-Y4 osteocitos liberan ATP al medio extracelular. Se ha propuesto que estas liberaciones generan una comunicación autocrina y paracrina con el resto de las células óseas, modificando la formación y

resorción ósea (Burnstock et al., 2013; Orriss, Burnstock, & Arnett, 2010; Rumney et al., 2012).

1.10 Liberación de ATP en células de remodelación ósea.

Se ha reportado que osteoblastos derivados de la línea celular MC3T3-E1 presentan liberaciones basales de ATP las cuales se incrementan 10 veces en los primeros 20 seg post movimiento del medio extracelular, los cuales has sido corroborados con otros tipos de estimulación mecánica como compresión, estiramiento y flujo turbulento (Genetos et al., 2005; Romanello et al., 2005; Thi, Islam, Suadiciani, & Spray, 2012; Thompson et al., 2012). En estos estudios se determinó que la liberación de ATP es dependiente de los cambios en la concentración de calcio intracelular, para lo cual, utilizaron quelantes de calcio como BAPTA, que disminuye las concentraciones de calcio citoplasmáticas encontrando una reducción de la liberación de ATP, pero además utilizaron sustancias que incrementan las concentraciones de calcio citoplasmático, como ionomicina encontrando un incremento en la liberación de ATP. Actualmente se ha hipotetizado que estos transitorios de calcio se dan a partir de la activación de canales de calcio sensibles a estimulación mecánica que activan canales de calcio voltaje dependientes (figura 6) (Genetos et al., 2005; Thompson et al., 2012). En este trabajo, demostraron además la presencia de vesículas con ATP a través del marcaje con quinacrina, encontrando que el bloqueo farmacológico de la ruta exocítica reduce significativamente la liberación de ATP por estimulación mecánica. Un punto importante de estos estudios es que se analizó el efecto autocrino de la liberación de ATP, encontrando que activa receptores P2Y, los cuales provocan señalizaciones intracelulares modificando su función (figura 6).

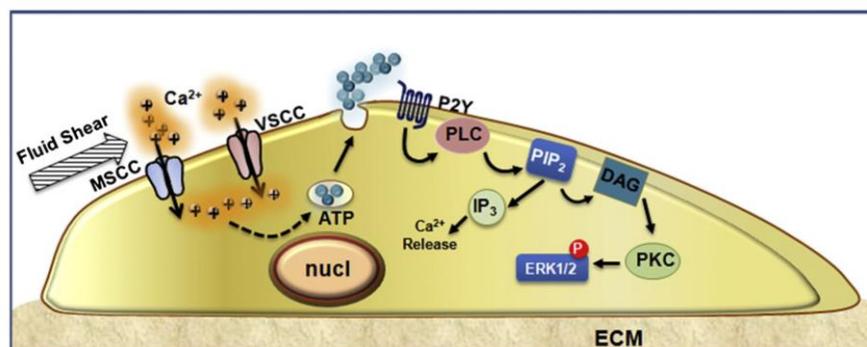


Figura 6. Modelo de liberación de ATP post estímulo mecánico. El movimiento del medio activa canales de calcio mecano-sensibles (MSCC) los cuales llevan a una despolarización celular permitiendo la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje (VSCC) que provoca la liberación de ATP por vía vesicular. (Thompson et al., 2012).

Por su parte, en osteocitos se ha descrito que al igual que en los osteoblastos presentan liberación de ATP post movimiento del medio. A diferencia de los osteoblastos, en que la liberación es vía vesicular, en osteocitos es por vía conductiva, dependiente de hemicanales de conexina-43 (Cx-43). Se demostró que estos canales se abren con el estímulo mecánico y se postuló que serían importantes en la mecanotransducción (Genetos et al., 2007).

A diferencia de la información que se encuentra en los mecanismos de liberación de ATP por estímulos mecánicos desde osteoblastos y osteocitos, no hay información respecto si los osteoclastos liberan ATP por estímulos mecánicos. Los estudios que se encuentran registrados en la literatura de señales purinérgicas en el sistema óseo (Hoebertz, Arnett, & Burnstock, 2003; Orriss et al., 2010) demuestran que los osteoclastos presentan una fuerte regulación purinérgica a través de receptores P2X₂, P2X₇, P2Y₁ y P2Y₂, pero ambas revisiones consideran como fuente de ATP la liberación desde osteoblastos y osteocitos por estimulación mecánica. Sin embargo, un estudio realizado en osteoclastos encontró que la utilización de inhibidores farmacológicos de receptores P2X₇ disminuían en un 80% los niveles extracelulares de ATP en condiciones basales (Brandao-Burch, Key, Patel, Arnett, & Orriss, 2012), lo que es un primer indicio que estas células también presentan liberaciones de ATP que pueden influir de forma autocrina y paracrina.

A pesar de que en la actualidad se ha considerado que los osteocitos son las células responsables de la mecanotransducción a nivel óseo, ya hay estudios que evidencian que los osteoblastos también presentan respuestas ante el movimiento del medio. En osteoclastos en los últimos años se ha evidenciado que los movimientos del medio generan oscilaciones de calcio intracelular (Li et al., 2018) al igual que sucede con los osteocitos y los osteoblastos. Estas oscilaciones de calcio intracelulares mediadas por el movimiento del medio en osteoclastos y osteoblastos dependen de canales de calcio mecanosensibles dentro de los cuales se encuentran STIM1 y TRPV4 (Li et al., 2018). Estos resultados, más la presencia de vesículas de ATP reportadas en osteoclastos (Brandao-Burch et al., 2012) abren la posibilidad que estas células también puedan generar aumentos de la liberación de ATP post estímulo mecánico.

Teniendo en cuenta lo anterior y dado la acción coordinada de músculos y huesos en el sistema musculoesquelético con la estructura muscular, el presente trabajo plantea la siguiente pregunta: ¿Participa el ATP extracelular en la comunicación paracrina entre las células óseas y el músculo esquelético cercano?

1.11 Generalidades de tejido muscular.

Los músculos corresponden al tejido del cuerpo responsable de realizar movimientos y mantener la postura, dentro de muchas otras funciones y constituyen el 50% de la masa corporal de un hombre en etapa adulta. Se pueden identificar tres tipos distintos de músculos: liso, cardíaco y esquelético. El músculo liso rodea los vasos sanguíneos y forma parte del revestimiento de órganos internos, tales como el estómago, los intestinos, las vías respiratorias, la vejiga y el útero. Este tipo de musculatura no presenta estriaciones o sarcómeros visibles y tampoco presenta placa neuromuscular, a diferencia del esquelético que presenta ambas. El músculo cardíaco presenta estriaciones y, como su nombre lo indica, se encuentra exclusivamente en el corazón (Matthews, 2003).

El músculo esquelético corresponde al tejido muscular encargado del movimiento y de la mantención de la postura corporal. Además, este tejido produce calor, permite la propiocepción y participa en la homeostasis de la glucosa, entre otras funciones. Es el tipo muscular más abundante del cuerpo humano y está formado por células cilíndricas alargadas y multinucleadas, que presentan un patrón estriado debido a la organización de las proteínas actina y miosina, esenciales para generar la contracción muscular. El músculo esquelético posee gran capacidad de adaptación a distintos estímulos, modificando su estructura y funcionalidad (Matthews, 2003).

El desarrollo del músculo esquelético comienza en la etapa embrionaria, donde los factores MyoD y Myf5 juegan un rol determinante en la generación de mioblastos. Posteriormente, los mioblastos se fusionan entre sí para dar origen a miotubos primarios, los que posteriormente generan miotubos secundarios, para finalmente agruparse en células poligonales estrechamente empaquetadas: la fibra muscular adulta (Buckingham et al., 2003).

Una de las principales funciones del músculo esquelético es generar movimiento dependiente del fenómeno de contracción. La unidad funcional de la contracción muscular es el sarcómero, que se compone de dos tipos distintos de miofilamentos: filamentos delgados, de actina, y filamentos gruesos, de miosina. Estas proteínas son esenciales para el proceso de contracción muscular, en el que también juega un rol importante el ion calcio (Ca^{2+}). El Ca^{2+} además regula la expresión de genes en las células musculares, con potencial relevancia en el proceso de plasticidad muscular (Carrasco et al., 2003; Ebashi, Nonomura, Kohama, Kitazawa, & Mikawa, 1980).

Una característica importante que presenta el músculo esquelético es su gran capacidad de adaptarse a los estímulos como actividad contráctil (ejercicios de fuerza o resistencia), condiciones de carga (microgravedad o sobrecarga), intervenciones nutricionales o cambios ambientales (hipoxia).

1.12 Señales purinérgicas en el músculo esquelético.

En los últimos años nuestro grupo de investigación ha demostrado que el ATP extracelular es un mediador relevante entre la despolarización y los aumentos transitorios de calcio citosólico en el músculo esquelético (Buvinic et al., 2009; Casas, Buvinic, & Jaimovich, 2014). El ATP es liberado desde las motoneuronas por vía vesicular como co-transmisor con acetilcolina (Grishin et al., 2006) y, además, es liberado desde las fibras musculares a través de Pnx1 en respuesta a la despolarización de la membrana plasmática (Buvinic et al., 2009). Los ARNm para todos los subtipos de receptores P2X (1-7) y los receptores P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ y P2Y₁₁ han sido descritos en miotubos derivados de ratas neonatas (Buvinic et al., 2009), los que generan transitorios de calcio citosólico en respuesta a nucleótidos extracelulares. En fibras de músculo FDB de ratón se ha demostrado la expresión principal de receptores P2Y₁, P2Y₂, P2Y₁₃ y P2Y₁₄, que varía con la actividad física, regulando así la sensibilidad a ATP extracelular (Fernandez-Verdejo, Casas, Galgani, Jaimovich, & Buvinic, 2014). Un importante avance en los efectos del ATP extracelular sobre el músculo esquelético es su papel como mediador entre la despolarización de la membrana y la expresión de genes, en el proceso denominado “acoplamiento excitación-transcripción”. Se ha demostrado que tantos

genes tempranos (cfos) o tardíos (interleuquina 6) relevantes en la fisiología muscular aumentan su expresión en respuesta a ATP exógeno (Buvinic et al., 2009), pero además, el ATP extracelular presenta cambios en la transcripción de genes relacionados con la plasticidad muscular como sucede con la troponina I, la cual, el ATP extracelular incrementa la expresión de troponina I lenta y disminuye la expresión de la isoforma rápida (Jorquera et al., 2013). Más aún, la expresión de genes inducida por despolarización de la membrana plasmática se inhibe con antagonistas y bloqueadores de la vía de ATP extracelular, lo que sitúa al ATP como un mediador fundamental para el acoplamiento excitación-transcripción y la plasticidad muscular (Bustamante, Fernandez-Verdejo, Jaimovich, & Buvinic, 2014; Jorquera et al., 2013). Además, se ha reportado el rol anti-apoptótico de la señalización purinérgica en fibras musculares, que se desregula y se transforma en estímulo pro-apoptótico en patologías musculares como la distrofia muscular de *Duchenne* (Valladares et al., 2013). En nuestro laboratorio además hemos reportado que en células musculares el ATP extracelular incrementa la translocación a la superficie celular del transportador de glucosa Glut4, a través de receptores purinérgicos y activación de la vía fosfoinositol 3 quinasa (PI3K) y proteína quinasa B (Akt) (Osorio-Fuentealba et al., 2013).

Teniendo en cuenta que ATP extracelular es una molécula importante en el control de la expresión génica, que activa la vía de señalización de Akt, y promueve la entrada de glucosa a las fibras musculares, es interesante evaluar si es un inductor de la síntesis proteica en las fibras musculares, actuando como un factor trófico para la mantención de la masa muscular.

1.13 Efectos del ATP extracelular sobre la vía PI3K/Akt/mTOR.

La masa muscular está determinada por los procesos contrapuestos de síntesis y degradación de proteínas. Cada uno de estos procesos presenta diferentes vías celulares, dentro de las que se destacan la vía PI3K-Akt-mTOR-S6K1 como la principal ruta de síntesis de proteínas y las vías miostatina/SMAD y E3 ubiquitina-ligasa-proteosoma como las rutas principales de degradación (Bodine et al., 2001; Leger et al., 2006; Schiaffino & Mammucari, 2011). En estudios realizados en fibroblastos (Gerasimovskaya et al., 2005), células mesangiales renales (Huwiler, Rolz, Dorsch, Ren, & Pfeilschifter, 2002), células de cáncer de mama (Bilbao,

Santillan, & Boland, 2010), osteoblastos (Katz, Ayala, Santillan, & Boland, 2011) y neuronas (Hu et al., 2010), se ha demostrado que el ATP extracelular aumenta la fosforilación de Akt en serina 473 (S473) y en treonina 308 (T308), de manera dependiente de receptores para nucleótidos de la familia P2Y y activación de PI3K. La proteína Akt en músculo esquelético es una quinasa importante de señalización río abajo de factores de crecimiento, cuyo efector es la fosforilación del complejo de esclerosis tuberoso 1 y 2 (TSC1y2); esta fosforilación incrementa la unión de GTP a Rheb (su forma activa) activando al objetivo de rapamicina de mamífero (mTOR1). La activación de la ruta PI3K-Akt-mTOR y sus intermediarios se ha demostrado en fibroblastos y neuronas en presencia de ATP extracelular (Gerasimovskaya et al., 2005; Hu et al., 2010). En músculo esquelético, se ha descrito que mTORC1 regula la síntesis de proteínas a través de 2 vías: a través de la proteína S6K1 o a través de la proteína de unión al factor 4E (4E-BP1) (Dupont, Cieniewski-Bernard, Bastide, & Stevens, 2011; Schiaffino & Mammucari, 2011). mTOR fosforila a S6K1 en T(389) y la activa. La quinasa S6K1 fosforila a la proteína ribosomal S6 (rpS6) en el residuo S(235/236), provocando la biogénesis de ribosomas. Pero, además, S6K1 fosforila a la quinasa del factor de elongación2 (eEF2K), que activará al factor de elongación 2 (eEF2) que promueve la síntesis proteica. Por último, mTOR fosforila a la proteína 4E-BP1 en T(37), lo que permite que se disocie del factor iniciador de la traducción 4E (eIF4E), el cual se asocia con el factor iniciador de la traducción 4G (eIF4G) estimulando la síntesis de proteínas figura 7 (Dupont et al., 2011; Schiaffino & Mammucari, 2011).

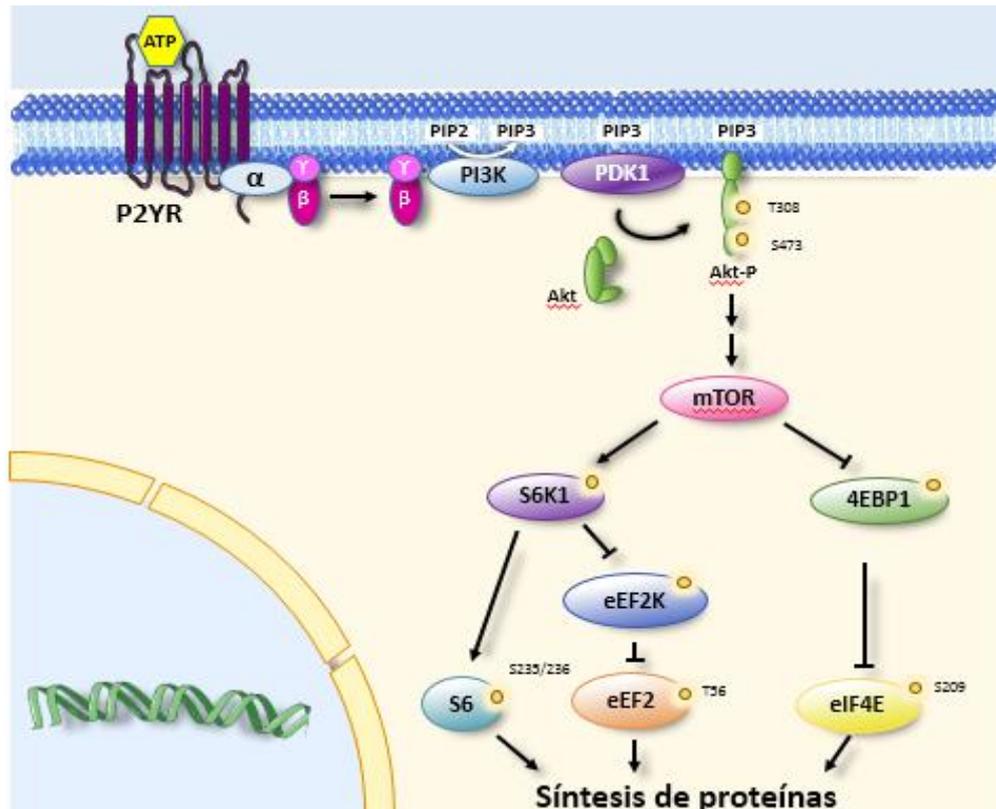


Figura 7. Esquema del efecto del ATP extracelular sobre la vía P2Y/PI3K/Akt/mTOR observada en estudios en fibroblastos y neuronas con sus posibles efectos sobre S6K1 y 4E-BP1 en la síntesis de proteínas (Schiaffino, Dyar, Ciciliot, Blaauw, & Sandri, 2013).

Considerando lo anterior, en esta tesis nos propusimos evaluar si el ATP extracelular promueve la síntesis proteica en músculo esquelético por activación de la vía PI3K/Akt/mTOR y fosforilación de rpS6 (S235/236) y 4E-BP1 (T37), como se muestra en la figura 7.

Teniendo en cuenta que:

1. Existe una relación entre la masa ósea y la masa muscular, que se ve afectada por aumento y disminución de la carga mecánica a lo largo del ciclo de vida.
2. Estímulos mecánicos aumentan la liberación de ATP desde células de remodelación ósea (tipo osteoblastos/osteocitos).
3. El ATP extracelular participa en la comunicación paracrina entre células óseas (osteoblastos/osteoclastos/osteocitos) regulando la masa ósea.
4. El músculo esquelético libera ATP durante su actividad y expresa receptores purinérgicos que regulan la expresión de genes.
5. En otros tipos celulares se ha demostrado que el ATP extracelular activa la vía PI3K-Akt-mTOR, que es una vía fundamental en la síntesis de proteínas en músculo esquelético regulando la masa muscular.

En este proyecto de investigación proponemos la siguiente hipótesis:

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis.

“Osteoclastos liberan ATP al medio extracelular por estímulos mecánicos y aumentan la síntesis de proteínas en músculo esquelético a través de la activación de receptores P2 asociados a la vía PI3K-Akt-mTOR”

2.2 OBJETIVOS.

2.2.1 Objetivo General.

Evaluar la liberación de ATP desde osteoclastos por estímulos mecánicos y determinar si el ATP liberado promueve la síntesis de proteínas en músculo esquelético por activación de receptores P2 asociados a la vía PI3K-Akt-mTOR.

2.2.2 Objetivos Específicos:

1. Caracterizar la liberación de ATP inducida por estimulación mecánica en osteoclastos.
2. Analizar el efecto del ATP exógeno en la síntesis de proteínas en músculo esquelético a través de la activación de receptores P2 asociados a la vía PI3K-Akt-mTOR.
3. Estudiar el efecto del medio condicionado de osteoclastos estimulados mecánicamente en la síntesis de proteínas en músculo esquelético a través de la activación de receptores P2 asociados a la vía PI3K-Akt-mTOR.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 Reactivos

Adenosina 5´trifosfato se obtuvo de Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO, EEUU). RANKL soluble fue de R&D Systems (Minneapolis, MN, EEUU).

Anticuerpos primarios para western blot:

Anti-GAPDH (ratón monoclonal, dilución 1:1000) se obtuvo de Santa Cruz Biotechnology Inc (Dallas, TX, EEUU). Los anticuerpos anti-Akt total (ratón, monoclonal, dilución 1:1000); anti-fosfo-Akt(S473) (conejo, monoclonal, dilución 1:1000); anti-mTOR total (conejo, monoclonal, dilución 1:1000); anti-fosfo-mTOR(S2448) (conejo, monoclonal, dilución 1:1000); anti-fosfo-p70S6K(T389) (conejo, monoclonal, dilución 1:1000); anti-S6K1 total (conejo, policlonal, dilución 1:2000); anti-fosfo-S6(S235/236) (ratón, monoclonal, dilución 1:1000); anti-fosfo-4E-BP1(T37/46) (conejo, monoclonal, dilución 1:1000) y anti-poliubiquitina K48 (conejo, policlonal, dilución 1:1000) se obtuvieron de Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EEUU). El anticuerpo anti-puromicina (ratón, monoclonal, dilución 1:10000) se obtuvo de EMD-Millipore (Temecula, CA, EEUU).

Anticuerpos secundarios para Western blot:

Anti-inmunoglobulina de conejo y anti-inmunoglobulina de ratón conjugadas con peroxidasa (dilución 1:5000) fueron de Santa Cruz Biotechnology Inc (Dallas, TX, EEUU).

Reactivos para inmunofluorescencia:

Dihidrocloruro Quinacrina se obtuvo de Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO, EEUU); El anticuerpo anti-Panexina 1 (Conejo policlonal, dilución 1:500); y el reactivo Hoechst 33342 fueron de Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU; El anticuerpo anti-P2X₇ (rata monoclonal, dilución 1:500) fue de Santa Cruz, Biotechnology Inc (Dallas, TX, EEUU) y los anticuerpos secundarios Alexa 488 y 555 fueron de Life technologies, Eugene, OR, EEUU.

Inhibidores farmacológicos:

Suramina (antagonista general de receptores P2X/P2Y), Brilliant Blue G (antagonista de receptores P2X₇), Rapamicina (inhibidor de mTOR) y Carbenoxolona (bloqueador de hemicanales de conexinas/panexinas) se obtuvieron de Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO, EEUU). LY294002 (inhibidor de PI3K) fue de Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EEUU) y Glibenclamida (bloqueador de la exocitosis) fue de Research Biochemicals International (Natick, MA, EEUU).

3.2 Línea celular de monocitos de ratón RAW 264.7 (ATCC®TIB-71™).

Las células fueron donadas por el Dr. Rolando VeARNI (Facultad de Odontología, Universidad de Chile) y se utilizaron en los pasajes 7-15. Las células se cultivaron en Medio Dulbeccos's Eagle Modificado con alta glucosa (4500 mg/L), L-glutamina (584 mg/L) y rojo fenol (*DMEM base*, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) suplementado con suero fetal bovino (Biological industries) 10%, penicilina 100 U/mL, estreptomina 100 µg/mL, y piruvato de sodio 1 mM, en ambiente húmedo con 5% de CO₂ a 37°C. El medio de cultivo se cambió cada 2-3 días y los pasajes se realizaron por disrupción mecánica al alcanzar 80% de confluencia. Para la diferenciación de estas células a osteoclastos, se cultivaron en presencia de 35 ng/mL de RANKL soluble (R&D Systems, Minneapolis, MN, EEUU) por 5 a 7 días. Para corroborar la diferenciación a osteoclastos, se evaluaron por transcripción reversa y PCR tiempo real (qPCR) los ARNm de los siguientes genes marcadores de osteoclastogénesis: fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP), Catepsina K, ATPasa lisosomal, Integrina β3, anhidrasa carbónica y metaloproteasa 9. Además, se realizó inmunocitoquímica contra TRAP.

Las células RAW 264.7 utilizadas durante la tesis se dividen operativamente en tres grupos: **RAW monocitos** (células RAW 264.7 sin tratamiento), **RAW 5d RANKL** (células RAW 264.7 incubadas 5d con RANKL 35 ng/mL, sin purificar) y **RAW osteoclastos** (células RAW 264.7 incubadas 7d con RANKL 35 ng/mL, con posterior purificación de osteoclastos por gradiente de suero).

3.3 Extracción y cuantificación del ARN total:

El ARN total se extrajo tratando a los cultivos RAW 264.7 monocitos/macrófagos y RAW 264.7 con 5 días de RANKL(osteoclastos) con el reactivo Trizol®, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los monocitos y los osteoclastos fueron tratados con 1 mL de Trizol fueron homogenizados con pipeta. Luego la preparación se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente, los lisados fueron tratados con 0,2 mL de cloroformo, y sometidos a agitación vigorosa durante 15 seg. Las muestras se dejaron reposar durante 3 min. a temperatura ambiente. Luego, se centrifugaron a 12.000 rpm durante 15 min. a 4°C. Se recuperó la fase acuosa que contiene el ARN y se precipitó con 0,5 mL de isopropanol frío a -20°C toda la noche, luego se centrifugó a 12.000 rpm por 10 min. a 4 °C. Se descartó el sobrenadante, se lavó con etanol al 75% frío (-20), y se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 min. a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en 40 µL de H₂O sin nucleasas. La concentración de ARN total se determinó con un espectrofotómetro mediante la medición de su absorbancia a 260 nm. (Synergy HTX Multi-Mode Reader).

3.4 Síntesis de cADN por transcripción inversa:

Se siguió el protocolo incluido en el sistema comercial para RT-PCR High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Se incubó una mezcla de 2 µg de ARN total, 0.8 µL dNTPs Mix 25X (100mM), 2 µL RT Random Primers 10X RT Buffer 10X, 1 µL MultiScribe® Reverse Transcriptase (50 U/µL) y H₂O sin nucleasa para completar 20 µL (25°C por 10 min., 37°C por 120 min., 85°C por 5 min., 4°C ∞).

3.5 PCR en tiempo real (qPCR):

El PCR en tiempo real se realizó en el equipo StepOne™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU). Se usó el kit para qPCR Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent, Santa Clara, CA, EEUU). El Master Mix contiene las concentraciones adecuadas de buffer PCR, Taq DNA polimerasa, MgCl₂, dNTPs y SYBR® Green. Se utilizó 1 µL de ADNc (diluido 1:3), 1,2 µL de mezcla de partidores (sentido+antisentido), concentración final 400-600 nM cada uno, dependiendo del partidador), 6 µL de Master Mix y 3.8 µL de H₂O sin

nucleasas. La concentración óptima de cada partidore se encontraba previamente estandarizada en nuestro laboratorio como aquella que entrega 95-105% de eficiencia en la reacción. Los partidores y su concentración final de uso se detallan a continuación en la tabla1:

Gen	Sentido	Antisentido
GAPDH (400 nM)	CAACTTTGGCATTGTGGAAG	CTGCTTCACCACCTTCTTG
TRAP (600 nM)	CGACCATTGTTAGCCACATACG	TCGTCCTGAAGATACTGCAGGTT
Catepsina K (600 nM)	ATATGTGGGCCAGGATGAAAGTT	TCGTTCCCCACAGGAATCTCT
A. Carbónica (400 nM)	CTCTGCTGGAATGTGTGACCT.	CTGAGCTGGACGCC AGTTGTC
Integrina Beta 3 (600 nM)	GGAAGAACTGTCACTGTCCT.	ACTAAAGCTCACCGTGTCTC.
ATPasa Lisosomal (600 nM)	ACGGTGATGTCACAGCAGACGT	CCTCTGGATAGAGCCTGCCGCA.
Metaloproteinasas 9 (600 nM)	GCTGACTACGATAAGGACGGCA.	GCGGCCCTCAAAGATGAACGG.

Tabla 1. Secuencia de los partidores utilizados para la detección de los niveles de ARNm en cultivos celulares de RAW 264.7. Las concentraciones que aparecen al lado de cada gen son las concentraciones finales de uso de cada pareja de partidores.

La amplificación del cADN se efectuó de acuerdo con el siguiente programa estándar de temperaturas: 95°C por 3 min y 40 ciclos de 95°C por 20 seg seguido de 60°C por 20 seg. La temperatura de lectura de fluorescencia se realizó durante la fase de extensión. Se realizaron reacciones sin ADN 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. La amplificación del gen constitutivo GAPDH se utilizó como control. Los valores fueron normalizados a la expresión de GAPDH y reportados bajo el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Pfaffl, 2001).

3.6 Estímulos mecánicos:

Se sembraron 20,000 células en 3 ml de medio en placas de 35mm con RANKL 35ng/ml por 5 días. En placas control se adicionó el medio sin RANKL durante los 5 días. Una hora antes de las mediciones de liberación de ATP post estímulo

mecánico se cambió el medio sin suero fetal bovino. El movimiento del medio se realizó a través del movimiento del medio de cultivo, caracterizado previamente por Rumney et al. 2012. Se realizó el movimiento de 12, 25, 37 y 50% del medio extracelular 10 veces, realizando un movimiento cada segundo. El movimiento se realizó con la punta de pipeta adherida a la pared de la placa de cultivo y en diagonal, para impedir la llegada de perturbación directa sobre las células que pudiera causar su desprendimiento o muerte.

3.7 Cuantificación de los niveles de ATP extracelular:

Se determinaron los niveles de ATP en el medio de cultivo de células RAW 264.7 diferenciadas, con y sin estímulo mecánico, mediante el kit *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay* (Promega, WI, EE.UU), basado en la reacción luciferina-luciferasa. Se tomaron 50 μ L de medio de cultivo a los tiempos indicados y se mezclaron con 20 μ L del kit de reacción, incubándose por 10 min en oscuridad. Luego, las muestras fueron cuantificadas en un luminómetro. En paralelo, se construyó una curva estándar de ATP (1 fmol-100 pmol); los valores obtenidos de las muestras fueron interpolados en la zona lineal de esta curva para determinar la cantidad de ATP presente en cada condición. Los valores se normalizaron de acuerdo con el volumen medido y a la cantidad de proteínas de cada pocillo, y expresados finalmente como pmol ATP/mg proteína.

3.8 Cuantificación de actividad de Lactato deshidrogenasa (LDH):

Se determinaron los niveles de LDH en el medio de cultivo de células RAW 264.7 diferenciadas, con y sin estímulo mecánico. LDH extracelular se cuantificó mediante el kit Pierce LDH Cytotoxicity Assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) basado en una reacción enzimática acoplada que genera un producto formazán rojo detectable a 490 nm. Se tomaron 50 μ L de medio de cultivo antes de la estimulación mecánica y a los 0.25; 0.5, 1, 5 y 10 min post estímulo y se mezclaron con 50 μ L del kit de reacción. Luego de 30 min de incubación, se adicionaron 50 μ L de la solución Stop. Luego, las muestras fueron cuantificadas por absorbancia a 490nm y 680nm. La absorbancia a 680 nm corresponde al ruido basal del instrumento, y se resta al valor de absorbancia obtenido a 490 nm. Para determinar la cantidad total de LDH intracelular (nivel máximo, control positivo), se

adicionó a las células buffer de lisis y se extrajo 50 μ L de cada placa para la medición.

3.9 Purificación de osteoclastos por gradientes de suero:

Para concentrar los osteoclastos, se utilizó el protocolo de gradiente de suero, que permite separar las células por densidad (Collin-Osdoby & Osdoby, 2012). Se cultivaron 2'000.000 células RAW264.7 en dos placas de 100 mm durante 7 días con 10 ml de medio en presencia de RANKL 35 ng/mL. Después de los 7 días, las células se trataron con una 5 ml de solución de digestión colagenasa-tripsina que estaba constituida por tripsina (1g en 100ml) más colagenasa tipo 3 (3g en 100ml) en una solución MHB durante 5 min. en incubadora, para hacer digestión de la matriz extracelular; luego se colocó una solución de digestión proteasa-EDTA que se preparó con proteasa (Sigma P-8811) 100mg en 100ml mas EDTA (2g en 100ml) durante 15 min. en incubadora para separar y soltar las interacciones de las células con la matriz extracelular. Las células provenientes de las dos placas de 100mm se transfirieron a la superficie de un tubo Falcon de 50 mL que contenía una capa inferior con 15 mL de SFB 70% (11,2 ml SFB mas 4,8ml de solución MHB) y una capa intermedia con 15 mL de SFB 40% (6,4 ml SFB mas 9,6 ml de solución MHB). Luego de 30 min, se colectaron las distintas fases de la gradiente, desde la superficie: fracción superior (17 mL), fracción media (16 mL) y fracción inferior (12 mL).

3.10 Citoquímica de TRAP.

Los cultivos celulares RAW monocitos, RAW 5d RANKL y RAW osteoclastos fueron sembrados en cubreobjetos. La tinción citoquímica contra TRAP se realizó con el kit Acid Phosphatase, Leukocyte (TRAP) Kit (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, EEUU), siguiendo las indicaciones del fabricante. El kit permite la tinción púrpura de células TRAP positivas, y la tinción con hematoxilina de los núcleos celulares. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio óptico Motic BA310E y analizadas en el programa de acceso libre ImageJ (NIH, EEUU). Tres imágenes fueron tomadas por cada cubre objeto en magnificación de 4x.

3.11 Caracterización fenotípica de los cultivos celulares.

Las células RAW control, RAW 5d RANKL y Osteoclastos purificados se trataron con 5 ml de solución de digestión colagenasa-tripsina que estaba constituida por tripsina (1g en 100ml) más colagenasa tipo 3 (3g en 100ml) en una solución MHB durante 5 min. en incubadora, para hacer digestión de la matriz extracelular; luego se colocó una solución de digestión proteasa-EDTA que se preparó con proteasa (Sigma P-8811) 100mg en 100ml mas EDTA (2g en 100ml) durante 15 min. en incubadora para separar y soltar las interacciones de las células con la matriz extracelular. Las células se lavaron y fijaron en 100 ml de PBS 1x/BSA al 1 % paraformaldehído al 1% y se analizaron en el citómetro de flujo FACScan. Se analizaron 30.000 eventos en los cuales se analizaron los parámetros de tamaño (FSC) y granularidad (SSC). El análisis de datos se realizó utilizando el programa gratuito de análisis de datos de citometría de flujo Flowing Software 2.5.1.

3.12 Inmunofluorescencia.

Las células fueron cultivadas y tratadas en cubreobjetos de vidrio. Las células fueron lavadas 2 veces con tampón fosfato salino (PBS) 1X (137 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 2,7 mM KCl, pH 7,4) y posteriormente se fijaron en metanol frío por 15 min a 4°C. Luego se lavaron 4 veces con PBS 1X y se bloquearon durante 1 h con una solución PBS 1X-BSA 1%. Para marcar las vesículas con ATP utilizó 25 µM de Quinacrina (Sigma-Aldrich Corp.) por 30 min., se enjuagaron las células dos veces en PBS y luego siguió con el proceso de fijación. Se incubaron toda la noche con el anticuerpo primario específico a 4°C. Se lavaron tres veces con PBS-BSA1% y se incubaron 2 h con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado con un fluoróforo a 37°C. Para la marcación de los núcleos utilizamos la tinción Hoechst (Molecular Probes; 1:2.000) en PBS durante 10 min., posteriormente las muestras se lavaron 3 veces con PBS-BSA1% y se montaron en los portaobjetos utilizando medio de montaje (Dako Fluorescence Mounting Medium). Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal (microscopio Carl Zeiss Axiovert 135 M–LSM Microsystems) y analizadas posteriormente utilizando el programa de libre acceso ImageJ (NIH, EEUU).

3.13 Disección de músculos FDB.

El músculo FDB de ratones BalbC (6-8 semanas) se obtuvieron por disección y se estabilizó en medio *DMEM* base suplementado con piruvato de sodio 1 mM, penicilina 100 U/mL, estreptomycin 100 µg/mL y suero de caballo (HS) 1 % durante 2 h a 37 °C. Luego del tiempo indicado, se realizaron los ensayos con tratamientos de ATP o medio condicionado. Los animales fueron manipulados de acuerdo con el protocolo de bioética aprobado por el “Comité de Bioética sobre Investigación en Animales” de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile, N° CBAE#061501 FMUCH (Asociado al proyecto Fondecyt N°1151353) anexo 1.

3.14 Western Blot.

Los músculos FDB sometidos a los distintos estímulos se lisaron en hielo en 150 µl de tampón de lisis (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, EDTA 2 mM) suplementado con inhibidores de proteasas y de fosfatasa (cóctel inhibidor de proteasas Calbiochem Set III 1:200, PMSF 1 mM, Na₃VO₄ 10 mM, NaF 20 mM, pirofosfato de sodio 10 mM). Los lisados celulares se sonicaron por 3 min, se incubaron 30 min en hielo, y se centrifugaron a 4°C, 12000 rpm por 15 min. en centrífuga eppendorf para remover los restos celulares. La concentración de proteínas de los sobrenadantes se determinó con utilizando el método de precipitación con ácido sulfosalicílico (método turbidimétrico) y medición por espectrofotometría a 405 nm. Los datos se interpolaron en una curva estándar realizada con albúmina de suero bovino. Las proteínas del lisado fueron resuspendidas en un buffer de carga (Tris-HCl 62,6 mM, pH 6,8; dodecil sulfato de sodio (SDS) 2%; azul de bromofenol 0,01%; glicerol 10% y DTT 100 mM), y se resolvieron por electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida al 10%. Las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF (*Di-fluoruro de polivinilideno*) a 350 mA durante 120 min. Las membranas se bloquearon a temperatura ambiente durante 1 h en tampón TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.6) suplementado con leche descremada al 3%, con Tween 20 0,5%. Luego fueron incubadas con los anticuerpos primarios correspondientes durante toda la noche a 4°C. Las membranas fueron lavadas tres veces con una solución TBS-Tween 1% y luego incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa, a temperatura ambiente durante 1 h. Una vez completada esta etapa, las membranas fueron lavadas tres veces por 15 min con

una solución TBS-Tween 1% a temperatura ambiente en agitación constante. La visualización de la marca quimioluminiscente se realizó con un kit (RapidStep™ ECL Reagent, Calbiochem, EMD Chemicals, Gibbstown, NJ, EEUU). Posteriormente, las membranas fueron recuperadas y tratadas con una solución que permite retirar los anticuerpos previamente utilizados (glicina 0,2 M pH 2, Tween 20 1% por 30 min en agitación constante a temperatura ambiente) e incubar con un anticuerpo control. Para la normalización de la carga de proteínas en el gel se utilizó GAPDH o la tinción completa del gel con solución rojo Ponceau (Ponceau S 0,1%, ácido acético 1%). Las imágenes fueron analizadas por densitometría con el programa de libre acceso ImageJ (NIH, EEUU).

3.15 Determinación de la síntesis de proteínas a través de la técnica SUnSET (*Surface Sensing of Translation*).

Esta técnica permite el monitoreo y cuantificación de la síntesis global de proteínas en células en cultivo (*in vitro*) o en tejidos completos (*in vivo*) (Goodman & Hornberger, 2013; Schmidt, Clavarino, Ceppi, & Pierre, 2009). Se utilizó puromicina (antibiótico aminonucleósido), que presenta una estructura análoga al aminoacil tARNs, permitiendo que se incorpore a la cadena polipeptídica nascente y prevenga su elongación. Cuando se utiliza en cantidades pequeñas, la puromicina se incorpora en las proteínas neosintetizadas reflejando directamente la tasa de traducción del ARNm (Schmidt et al., 2009). En músculos FDB aislados se realizaron pulsos de puromicina (Calbiochem; EMD Chemicals, Gibbstown, NJ, EEUU) 10 mg/mL por 45 min previo a la colocación del estímulo de ATP o al movimiento del medio en las cámaras Transwell®. Luego de este tiempo se reemplazó el medio por uno sin puromicina y se realizó la caza 30 min después. Todo el ensayo se realizó en medio base con HS 1%. La incorporación de puromicina a las muestras se evaluó mediante inmunoblot, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-puromicina (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, EEUU).

3.16 Comunicación paracrina entre osteoclastos purificados y músculo FDB.

La habilidad de los osteoclastos purificados para tener una comunicación paracrina con el músculo FDB fue evaluada mediante el ensayo Transwell®. Este ensayo se realizó en placas Transwell® de 12 pocillos provistos con una membrana de

poliester con poros de 0,4 μm (Corning, NY, USA). Esta placa consta de dos cámaras: una cámara inferior en la cual se agregaron 800 μL de DMEM suplementado con 10% SFB. En la cámara superior se sembraron en promedio 736458 ± 81250 de los osteoclastos purificados en un área de sembrado de $1,12\text{cm}^2$ 24 h a 37°C en atmósfera humedecida con 5% de CO_2 . Luego de 24 h se procedió a los experimentos de comunicación para lo cual se cambió el medio de la cámara superior por 800 μL de DMEM suplementado con 1% HS y en la cámara inferior se colocó el músculo FDB en 1 ml DMEM suplementado con 1% HS después de 1 hora de estabilización se procedió al estímulo mecánico en el compartimento superior. Para la determinación de la síntesis de proteínas, la puromicina fue adicionada 5 min. previos al estímulo mecánico de los osteoclastos purificados y los diferentes inhibidos como suramina, LY294002 y Rapamicina se colocaron 30 min. Antes de la estimulación mecánica en el compartimento inferior.

3.17 Presentación de datos y Análisis Estadístico.

Los datos se informan como promedio \pm error estándar del promedio (SEM). Dado que los datos presentan un n de 3 a 6, se utilizó estadística no paramétrica para las comparaciones. Las comparaciones entre los grupos se realizaron mediante el test no pareado de Mann-Whitney cuando existió una única condición contra un control. Para comparaciones múltiples, se utilizó el test de Kruskal-Wallis, seguido de la prueba post-hoc de Bonferroni de comparaciones múltiples. Un valor $p < 0,05$ fue considerado como límite de significancia. Los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa Graph Pad Prism 6 (La Jolla, CA, EEUU).

4. RESULTADOS

4.1 Estimulación mecánica de osteoclastos en cultivo induce salida de ATP al medio extracelular. Caracterización del modelo celular y de las vías de liberación.

4.1.1 RANKL genera la diferenciación de monocitos a osteoclastos.

La incubación de células RAW 264.7 con RANKL 35 ng/mL durante 5 días aumentó significativamente la expresión de los genes marcadores de osteoclastogénesis fosfatasa ácida resistente de tartrato (TRAP), metaloproteasa 9 (MMP9), catepsina K, anhidrasa carbónica, ATPasa lisosomal e integrina beta 3 (figura 8A). Esto fue corroborado con tinción citoquímica contra TRAP, en que se encontró la morfología clásica de osteoclastos, multinucleados y TRAP+ (figura 8B).

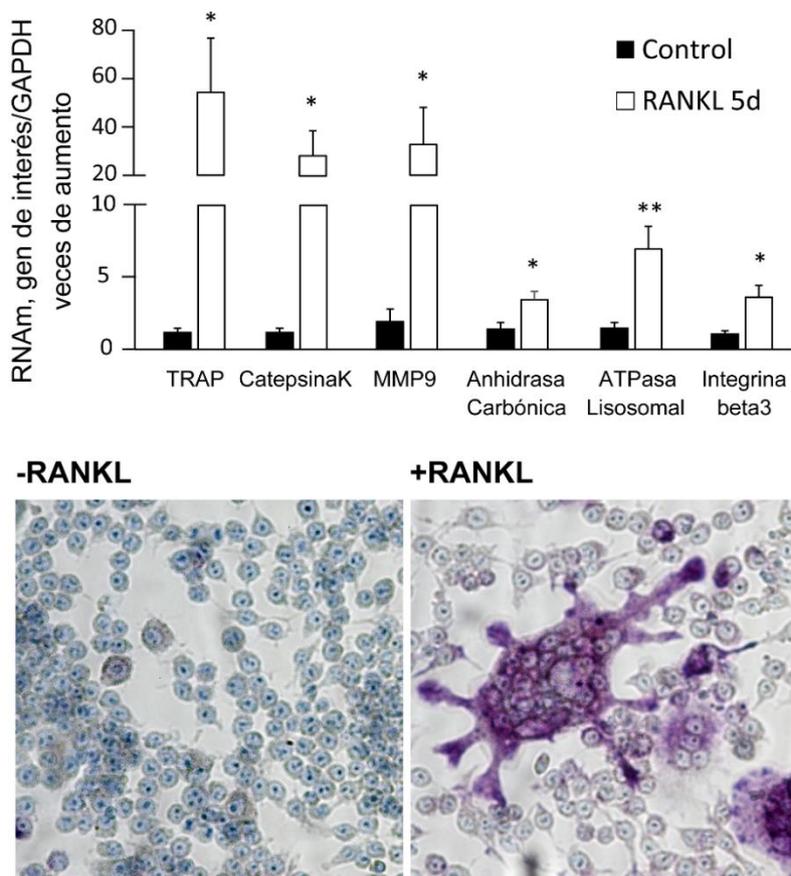


Figura 8. RANKL promueve la diferenciación de monocitos a osteoclastos. superior. La incubación de células RAW264.7 con RANKL (5d, 35 ng/ml) promueve la expresión de ARNm de marcadores osteoclastogénicos, los cuales fueron detectados por RT-qPCR. TRAP: Fosfatasa ácida resistente a tartrato, MMP9: Metaloproteína 9. n = 8. *: p<0.05; **: p<0.01, test Mann-Whitney. **Inferior.** La incubación con RANKL induce la formación de células multinucleadas TRAP+. La expresión de TRAP fue medida por citoquímica en células RAW264.7 en ausencia (-RANKL) o presencia (+RANKL) de RANKL (5d, 35 ng/mL). Las células fueron co-marcadas con hematoxilina. Se muestra una imagen representativa de n=3. Escala de la barra: 10 µm.

4.1.2 Estímulo mecánico promueve liberación de ATP de células RAW monocitos y RAW 5d RANKL.

Teniendo en cuenta los resultados de diferenciación, el siguiente punto fue analizar si el estímulo mecánico promueve la liberación de ATP. Como estímulo mecánico, se utilizó el movimiento de distintos porcentajes del medio extracelular, en forma de 1 pipeteo/seg durante 10 seg. Las células RAW monocitos (figura 9A) y las células RAW 5d RANKL (figura 9B) mostraron una liberación rápida de ATP al medio extracelular luego del estímulo mecánico, con máximos a los 15-30 seg y vida media cercana a los 5 min. Se realizaron estudios movilizándolo un 12, 25, 37 o 50% del medio extracelular, y se observó que los máximos de ATP liberado se relacionan directamente al nivel de estimulación mecánica (figura 9A-B). Al graficar el punto de liberación máxima de ATP, se observan diferencias significativas con respecto a la liberación basal con movimientos del medio de 12, 25, 37 y 50%, generando en RAW monocitos incrementos de la liberación de 17, 21, 40 y 101 veces (figura 9C, barras blancas) y en RAW 5d RANKL de 10, 16, 23 y 42 veces (figura 9C, barras negras), respectivamente. No hubo diferencias en la liberación de ATP basal o a estímulos de 12%, 25% y 37% de movimiento del medio entre RAW monocitos y RAW 5d RANKL (figura 9C). Sin embargo, cuando se realizó el estímulo mecánico que movilizó el 50% del medio extracelular, las células RAW monocitos presentaron una liberación 2.6 veces mayor de ATP que las RAW 5d RANKL (Figura 9C, $p < 0.001$). Para descartar que los estímulos mecánicos provocaran lisis celular, se cuantificó lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio extracelular en presencia del estímulo de mayor magnitud (movimiento del 50% del medio). Los niveles de LDH se expresaron respecto a la máxima lectura obtenida posterior a la lisis química de las células (valor máximo del eje). No hubo variación en los niveles de LDH en RAW monocitos ni en RAW 5dRANKL con el estímulo mecánico (Anexo 2).

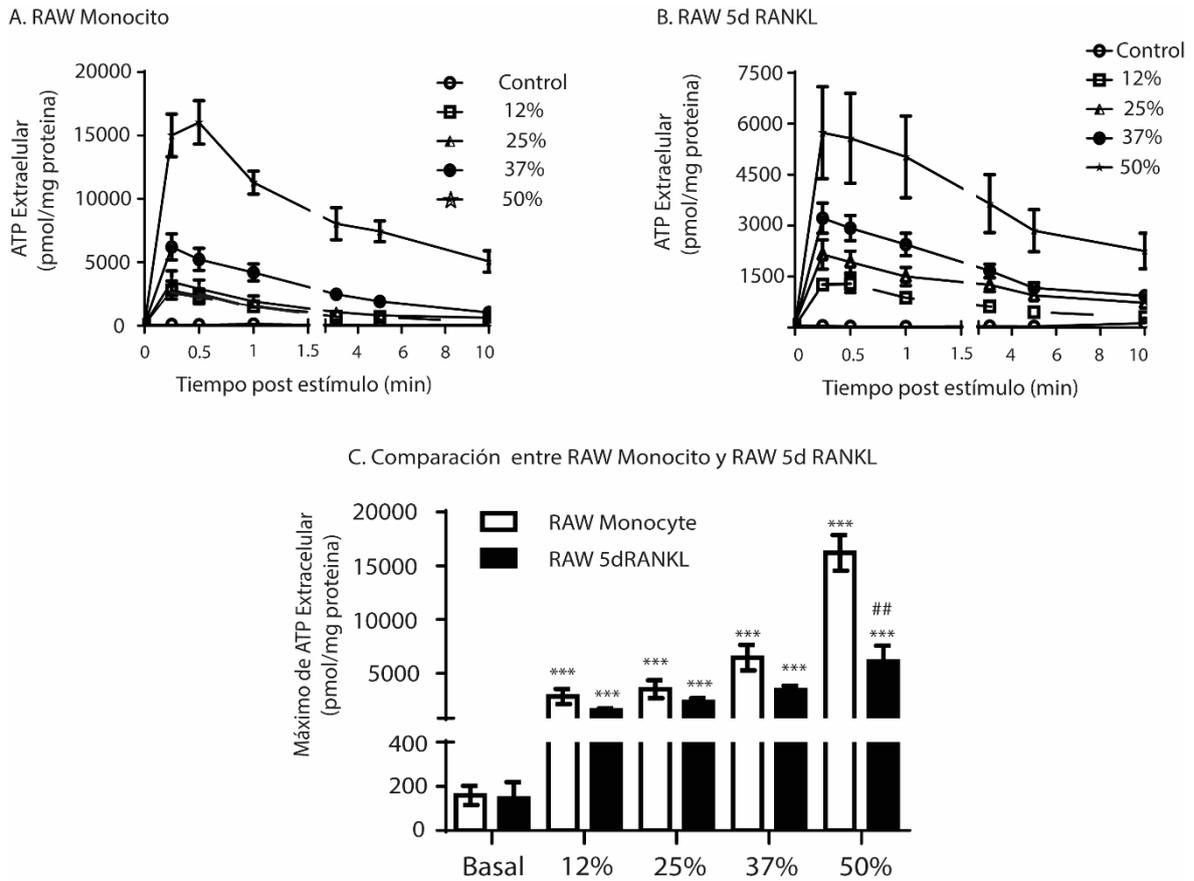


Figura 9. Estímulo mecánico induce liberación de ATP desde células RAW monocitos y RAW 5d RANKL. Células RAW monocitos (A) o RAW 5d RANKL (B) se sometieron a estimulación mecánica por movilización de distintos porcentajes del medio de cultivo (0-50%), cada 1 seg, durante 10 seg. A distintos tiempos post-estímulo, se tomaron alícuotas del medio de cultivo y se determinaron los niveles de ATP mediante la reacción luciferina-luciferasa. Los resultados se normalizaron por mg de proteínas. La línea “control” corresponde a mediciones en ausencia de movimiento del medio. C. Representación de la máxima liberación de ATP inducida por movimiento de distintos porcentajes de medio en RAW monocitos (barras blancas) y RAW 5d RANKL (barras negras). Para la gráfica se promedia el mayor valor obtenido en las cinéticas de liberación de ATP para cada “n” independiente. La condición “basal” corresponde a la medición de ATP previo a la perturbación mecánica. n=6. Todos los datos son representados con promedio ± SEM. Los asteriscos corresponden a las comparaciones con su propia basal. Los numerales corresponden a las comparaciones entre los grupos RAW monocitos y RAW 5d RANKL. ***: p<0.001; test de Mann Whitney. ##: p<0.01.

4.1.3 Bloqueadores de la vía conductiva (receptor P2X₇, panexina/conexina) inhiben la liberación de ATP inducida por estímulo mecánico en células RAW monocitos y RAW 5d RANKL.

Para caracterizar la vía de liberación de ATP basal y post estímulo mecánico en estas células se analizó el efecto de 3 inhibidores farmacológicos que bloquean componentes de la vía vesicular o de la vía conductiva (figura 10). Para bloquear la liberación de ATP por vía vesicular, se utilizó Glibenclamida 100 μM (inhibidor de

VNUT, transportador de ATP al interior de las vesículas). Para bloquear la liberación de ATP por vía conductiva, se utilizó Carbenoxolona (5 μM para inhibir panexinas o 100 μM para inhibir conexinas y panexinas) y Brilliant Blue G 50 nM (BBG, antagonista de receptores P2X₇). Se eligió el estímulo de 37% de medio movilizado para ensayar los bloqueos, ya que promueve una liberación de ATP de niveles intermedios entre los estímulos ensayados (figura 10), lo que permite ver aumentos o disminuciones en su efecto con las intervenciones.

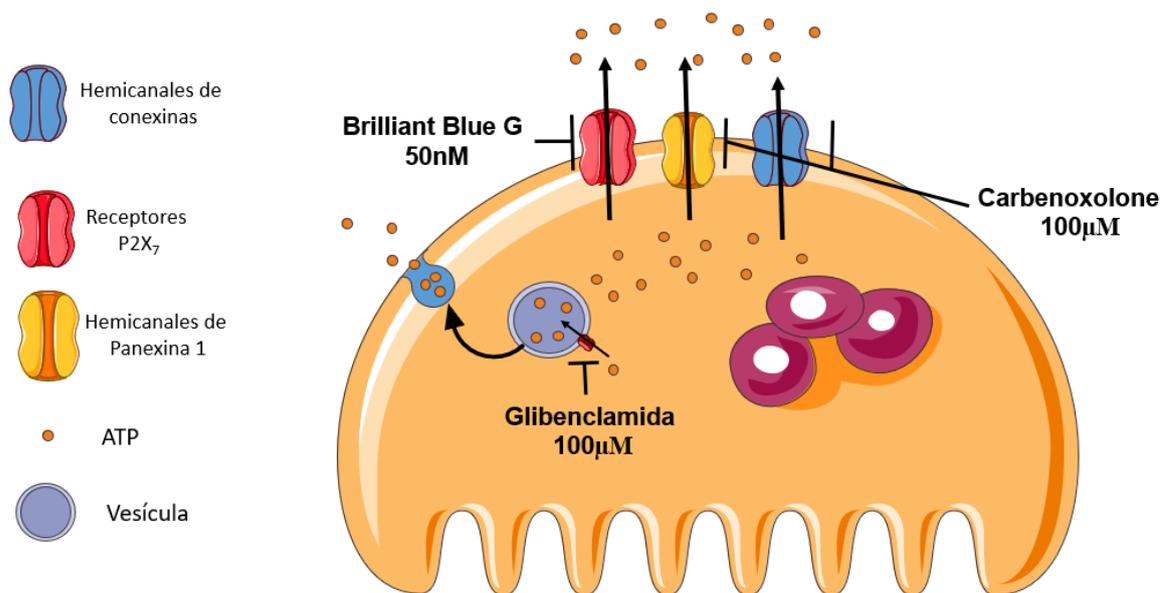


Figura 10. Estrategias farmacológicas de bloqueo de la liberación de ATP por vía conductiva o vía vesicular.

Ninguno de los inhibidores redujo significativamente la liberación basal de ATP en las células RAW monocitos (figura 11A), ni RAW 5d RANKL (figura 11B). BBG redujo la liberación de ATP post estímulo mecánico en un 44% y en un 41% en células RAW monocitos (figura 11C) y RAW 5d RANKL (figura 11D), respectivamente. Carbenoxolona en dosis bajas y altas (5 μM y 100 μM) redujo la liberación de ATP post estímulo mecánico tanto en células RAW monocitos (49%) como en RAW 5d RANKL (69%). Glibenclamida no tuvo efectos en ninguno de los dos grupos celulares (figuras 11C-D). De acuerdo con los datos anteriores, tanto el cultivo RAW Monocitos como RAW 5d RANKL liberan ATP post estímulo mecánico, lo que se reduce significativamente al inhibir el receptor P2X₇ o los canales de Pnx1.

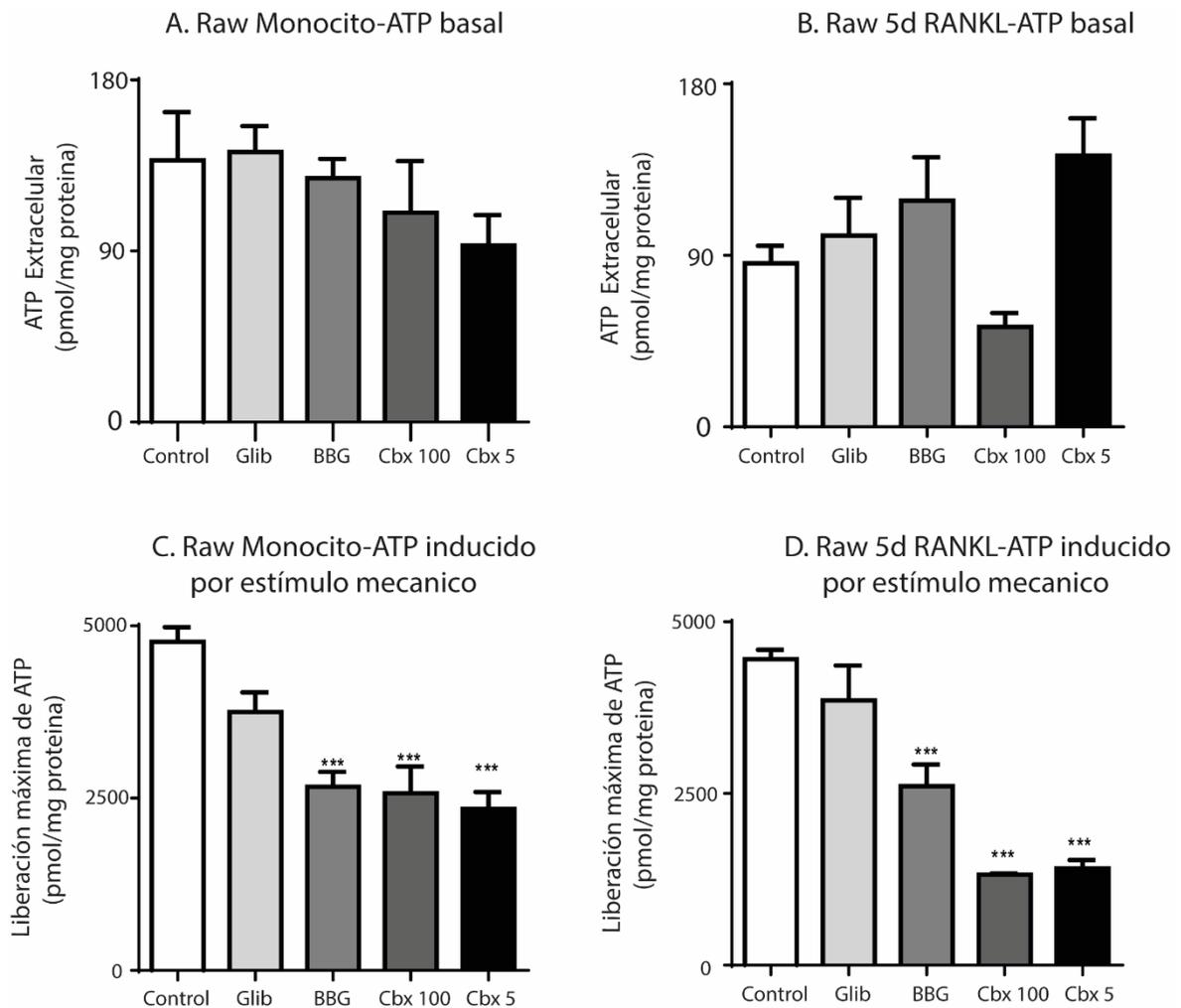


FIGURA 11. Bloqueadores de la vía conductiva (receptor P2X₇, panexina/conexina) inhiben la liberación de ATP inducida por estímulo mecánico en células RAW monocitos y RAW 5d RANKL. Se analizó el bloqueo de la liberación basal de ATP (A-B) o la máxima liberación de ATP inducida por estímulo mecánico de movimiento de medio 37% (C-D) por incubación 30 min antes y durante el ensayo con glibenclamida 100 μ M (Glib, bloqueador de liberación de ATP por vía vesicular), carbenoxolona 5 μ M (Cbx 5, bloqueador de hemicanales de panexina), carbenoxolona 100 μ M (Cbx 100, bloqueador de hemicanales de panexina y conexina) o Brilliant Blue G 50 nM (BBG, antagonista de receptores P2X₇). El ensayo se realizó tanto en células RAW monocitos (A-C) como en células RAW 5d RANKL (B-D). n=5. Todos los datos son representados como promedio \pm SEM., test de Kruskal-Wallis post-hoc Dunn's ***: p<0.001 respecto de su propio control.

4.1.4 Los cultivos RAW 5d RANKL presenta un 20% de marca TRAP+ y una alta proporción de células mononucleadas.

Los cultivos de células RAW 5d RANKL, además de presentar las células multinucleadas TRAP+ tipo osteoclastos esperadas, presentaron células mononucleares, tanto TRAP+ como TRAP- (figura 12). Esta diversidad de células puede estar dada por lo estadios previos en la diferenciación de monocitos a osteoclastos, los cuales son pro-osteoclastos y pre-osteoclastos. Considerando este punto, es posible que gran parte de la liberación de ATP observada en los

cultivos RAW 5d RANKL se deba al aporte de las células mononucleadas y no a los osteoclastos. Esto podría explicar en parte que ambos cultivos (RAW monocitos y RAW 5d RANKL) tengan las mismas características de liberación de ATP y de inhibición con bloqueadores farmacológicos.

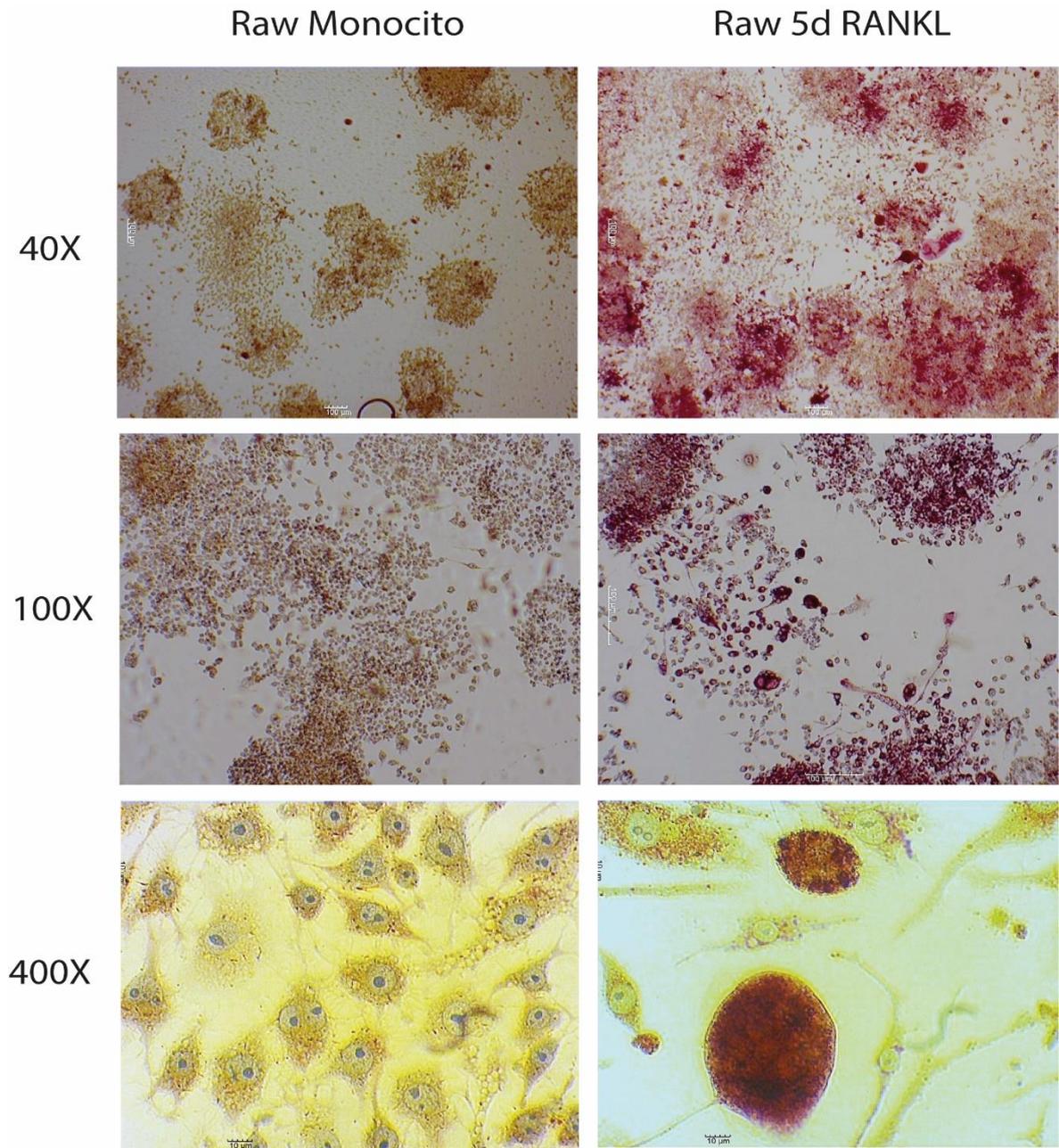


Figura 12. Expresión de TRAP analizada por citoquímica en células RAW monocitos o RAW 5d RANKL. Las células fueron co-marcadas con hematoxilina. Se muestran imágenes representativas de n=3, obtenidas en un microscopio óptico con diferentes aumentos (40X, 100X, 400X).

Para cuantificar la eficiencia de RANKL para diferenciar los monocitos a osteoclastos, células RAW se incubaron por 5-7 días con RANKL 35ng/ml; posteriormente se realizó tinción citoquímica contra TRAP y se cuantificó el área TRAP+ en imágenes adquiridas con magnificación 40X (figura 12 y 13A). El área con marcaje TRAP+ fue de un 5% en ausencia de RANKL y se elevó a 20% tras la incubación con RANKL (figura 13B). No hubo diferencias significativas entre 5-7 días de incubación con RANKL (figura 13B).

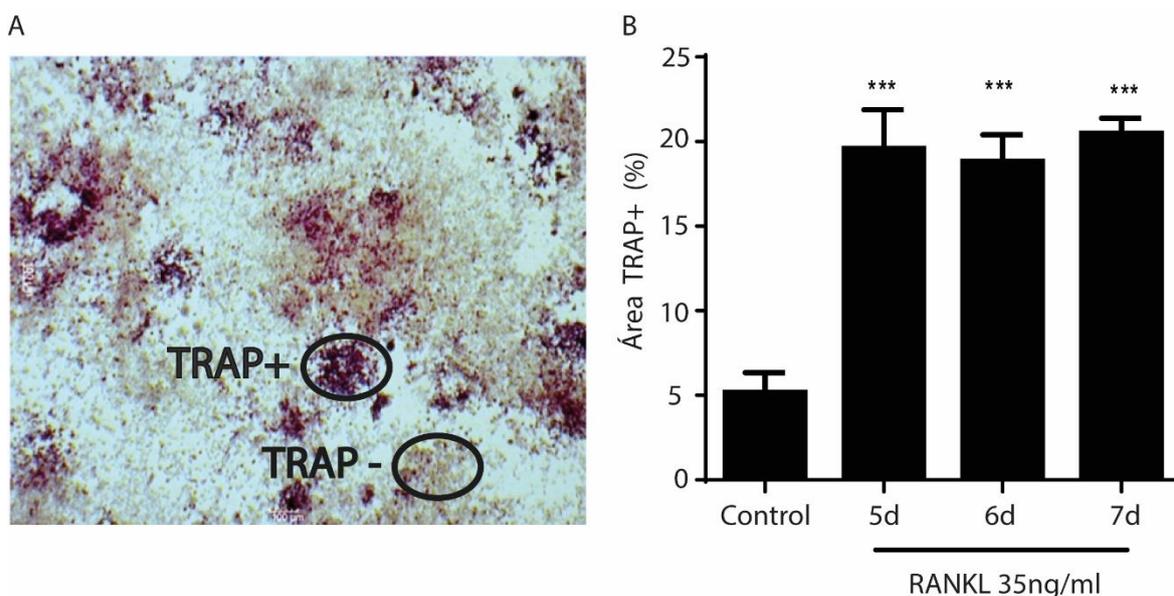


Figura 13. Cuantificación de la marca total de células TRAP+ en cultivos RAW 5-7d RANKL. Células RAW 264.7 fueron incubadas por 5-7 días en ausencia (Control) o presencia de RANKL 35 ng/mL. Se realizó citoquímica contra TRAP y las células fueron visualizadas en microscopio de luz y registradas a una magnificación de 40X (4X objetivo y 10X ocular) en 6 experimentos independientes. El área TRAP+ respecto del área total de células se cuantificó con el programa ImageJ. **A.** Foto representativa con tinción púrpura (TRAP+) y áreas de color café (TRAP-). Escala de la barra: 100 μ m. **B.** Cuantificación del porcentaje del área con marca TRAP+ post 5, 6 y 7 días de RANKL. n=6. Todos los datos fueron representados con el promedio \pm SEM. ***:p<0.001 respecto del control. test de Kruskal-Wallis, seguido de la prueba post-hoc de Bonferroni.

Esto indica que, pese a la incubación con RANKL, hay una gran proporción de células que pueden ser monocitos o estar en estados previos a osteoclastos (pro-osteoclasto o pre-osteoclastos). Además del ensayo de citoquímica y análisis de imágenes, utilizamos la técnica de citometría de flujo para caracterizar las poblaciones celulares derivadas de los cultivos RAW monocitos (Figura 14A) y RAW 5d RANKL (Figura 14B). En las gráficas se observa que la incubación con RANKL enriqueció en un 12,6% la población de células en el cuadrante superior derecho, que corresponde a células de mayor tamaño (parámetro de dispersión

frontal, FSC-H, eje X) y complejidad (parámetro de dispersión lateral, SSC-H, eje Y) (Figura 14 A-B). Posteriormente se construyó un histograma para representar el número de células respecto de su valor de FSC-H (figura 14C). Los cultivos RAW monocitos mostraron FSC-H entre 50 hasta 900 U.A, encontrando el mayor número de células entre 100 a 600 presentando un máximo en 250 U.A (figura 14C), mientras que el cultivo de RAW 5d RANKL presentó dos poblaciones de células: una entre 100 a 350 y otra entre 400 y 850 FSC-H (figura 14C), siendo esta última la de mayor cantidad. Comparativamente, los cultivos RAW monocitos presentaron cantidades significativamente mayores de células de 200 a 350 FSC-H que las células RAW 5d RANKL, mientras el cultivo RAW 5d RANKL presentó mayor cantidad de células de 400 a 850 FSC-H que el cultivo RAW monocito (figura 14C).

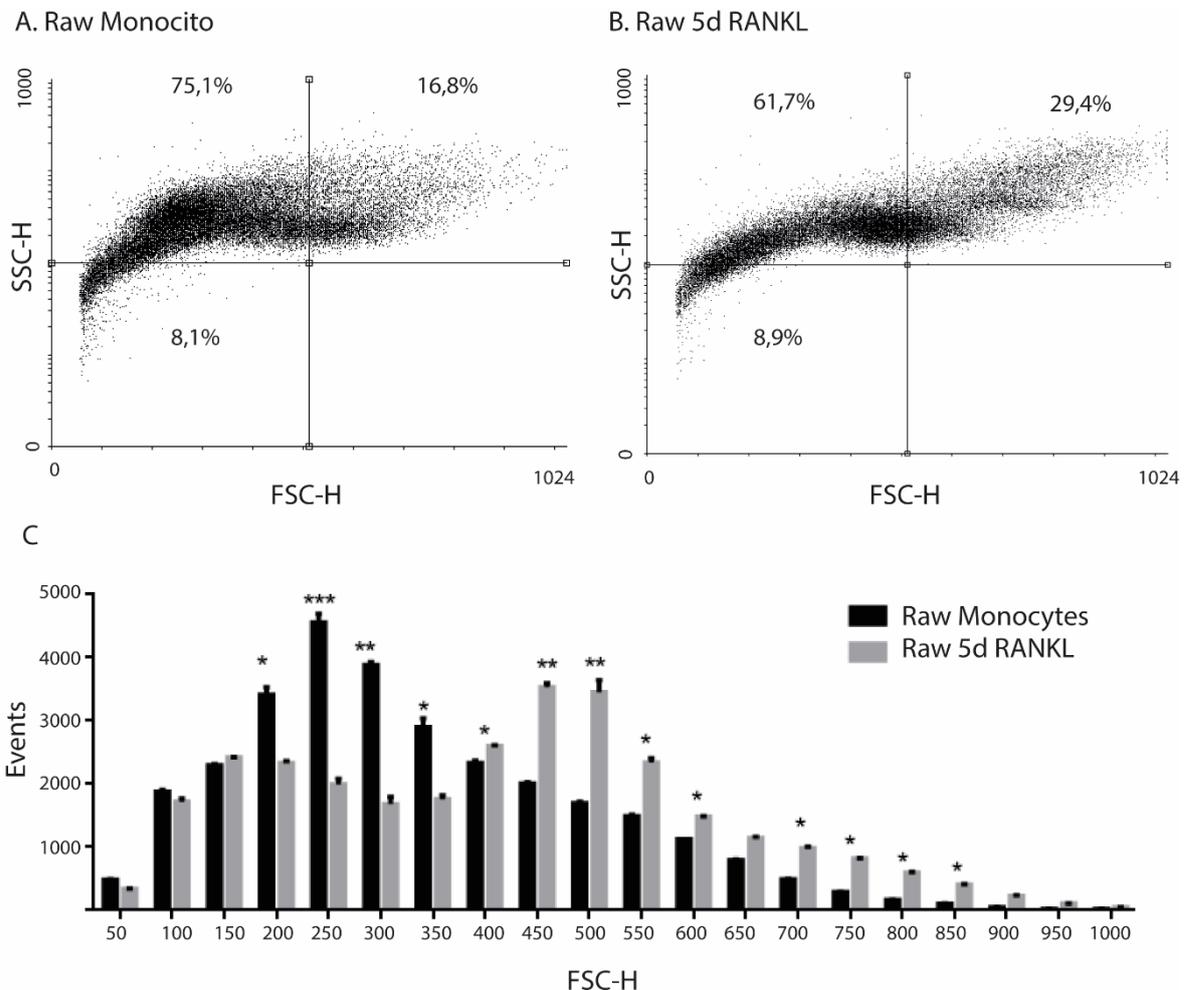


Figura 14. Caracterización de los cultivos RAW monocitos y RAW 5d RANKL a través de citometría de flujo. A-B. Análisis por citometría de flujo de los cultivos celulares RAW Monocito (A) y RAW 5d RANKL (B). C. Histograma de número de células respecto de su valor de dispersión frontal FSC-H derivado de la citometría de flujo para los cultivos RAW Monocito (barras negras) y RAW 5d RANKL (barras grises). n= 3. Promedio \pm SEM. *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001, test de Mann-Whitney comparando cultivo RAW monocito y RAW 5d RANKL para cada valor de FSC-H.

4.1.5 Utilización de una técnica de gradiente de suero para separar los osteoclastos de las células mononucleadas en cultivos RAW 5d RANKL.

Para descartar la influencia de células mononucleares en los eventos de liberación de ATP, estandarizamos la técnica de gradiente de suero para la purificación de osteoclastos, posterior a la incubación con RANKL. Con la técnica de gradiente de suero se obtuvieron 3 fracciones: superior, media e inferior (figura 15A). En cada fase se midió el porcentaje de células respecto del total, encontrando que en la capa superior presentó 51,3%, la capa media el 36,3% y la capa inferior el 12,3% de las células (Anexo 3). El análisis citoquímico contra TRAP mostró una fracción superior enriquecida en células mononucleares TRAP- (figura 15B) y una fracción inferior enriquecida en células multinucleadas TRAP+ (figura 15C). Además, por citometría de flujo se evaluó el parámetro FSC-H de las fracciones superiores e inferiores, encontrando que la fase superior presenta mayor cantidad de células entre 100 - 350 FSC-H (figura 15D, F) y la fase inferior presenta mayor cantidad de células entre 450-700 FSC-H (figura 15E, F), permitiendo con esta técnica separar las dos poblaciones celulares que se habían encontrado en los cultivos RAW 5d RANKL(figura 14C).

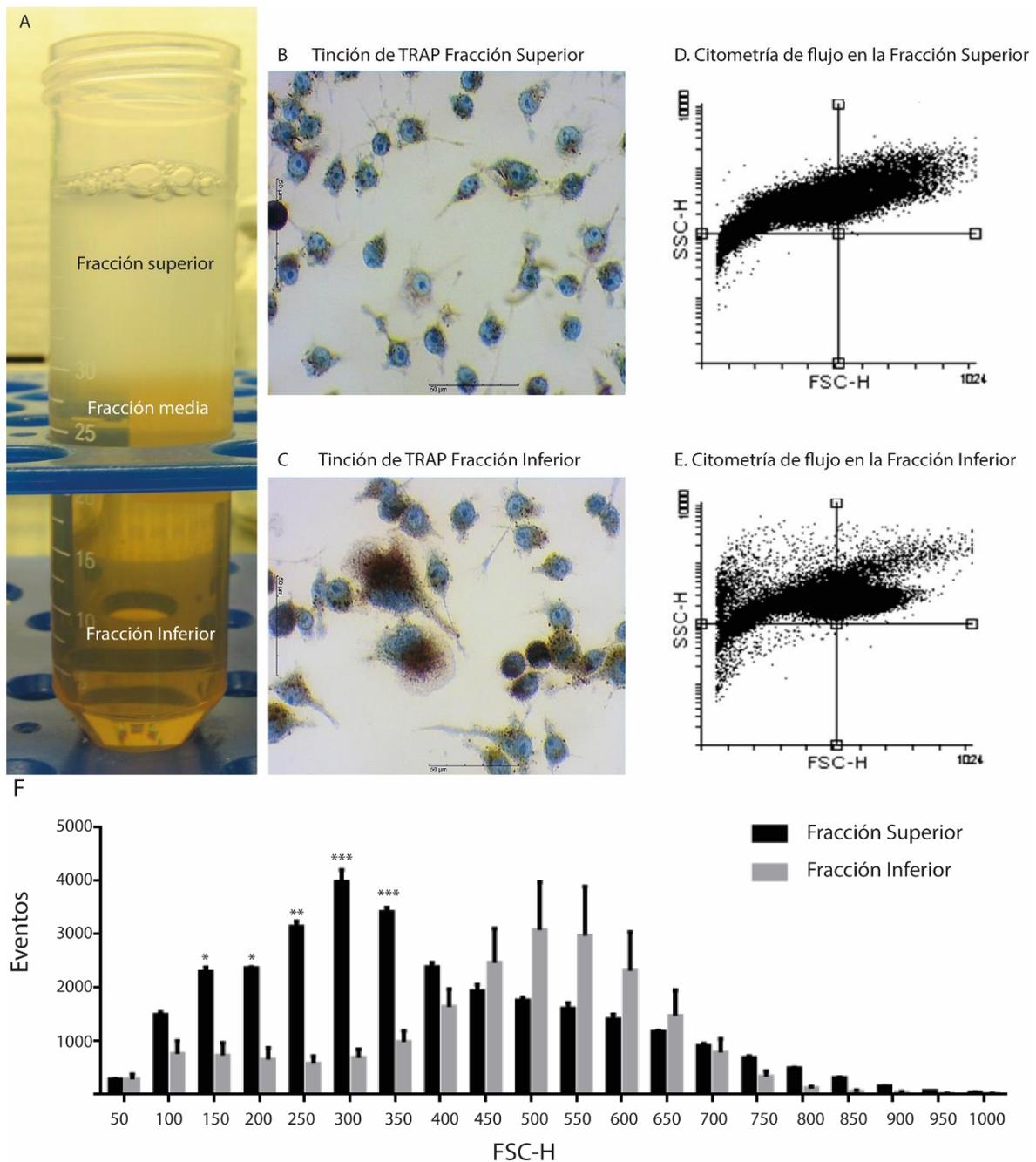


Figura 15. Purificación de osteoclastos por gradiente de suero. Células RAW incubadas por 5d con RANKL 35 ng/mL fueron purificadas en una gradiente de suero. **A.** Imagen representativa de la gradiente de suero, en que se evidencian las tres fases a recolectar: superior, media e inferior. **B-C.** Las fracciones superior (B) e inferior (C) fueron sembradas nuevamente y teñidas con citoquímica de TRAP y hematoxilina. Las células fueron visualizadas y registradas en microscopio de luz (magnificación de 400X). Escala de la barra: 50 µm. **D-E.** Análisis por citometría de flujo de células correspondientes a la fracción superior (D) e inferior (E). **F.** Histograma de número de células respecto de su valor de dispersión frontal FSC-H derivado de la citometría de flujo para la fracción superior (barras negras) e inferior (barras grises). n= 3. Promedio ± SEM. *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001, test de Mann-Whitney comparando fracción superior e inferior para cada valor de FSC-H.

4.1.6 Osteoclastos purificados expresan panexina 1 y receptores P2X₇ y presentan vesículas que contienen ATP.

Teniendo en cuenta que la técnica de gradiente de suero nos permitió tener una fracción inferior enriquecida con osteoclastos, se utilizaron estos cultivos para determinar la presencia de los componentes de las rutas de liberación de ATP descritas (vesicular y conductiva). Por microscopía confocal se observó tinción de los osteoclastos purificados con quinacrina (figura 16A), que es un fluorocromo sensible a ATP intra-vesicular que se acumula en las vesículas cargadas de ATP (Genetos et al., 2005; Liu, Liu, & Yang, 2016). Además, por inmunofluorescencia indirecta se demostró la expresión de panexina 1 (Figura 16B) y de los receptores P2X₇ (Figura 16C). Lo anterior demuestra la expresión de elementos de las vías de liberación de ATP vesicular y conductiva en los osteoclastos purificados.

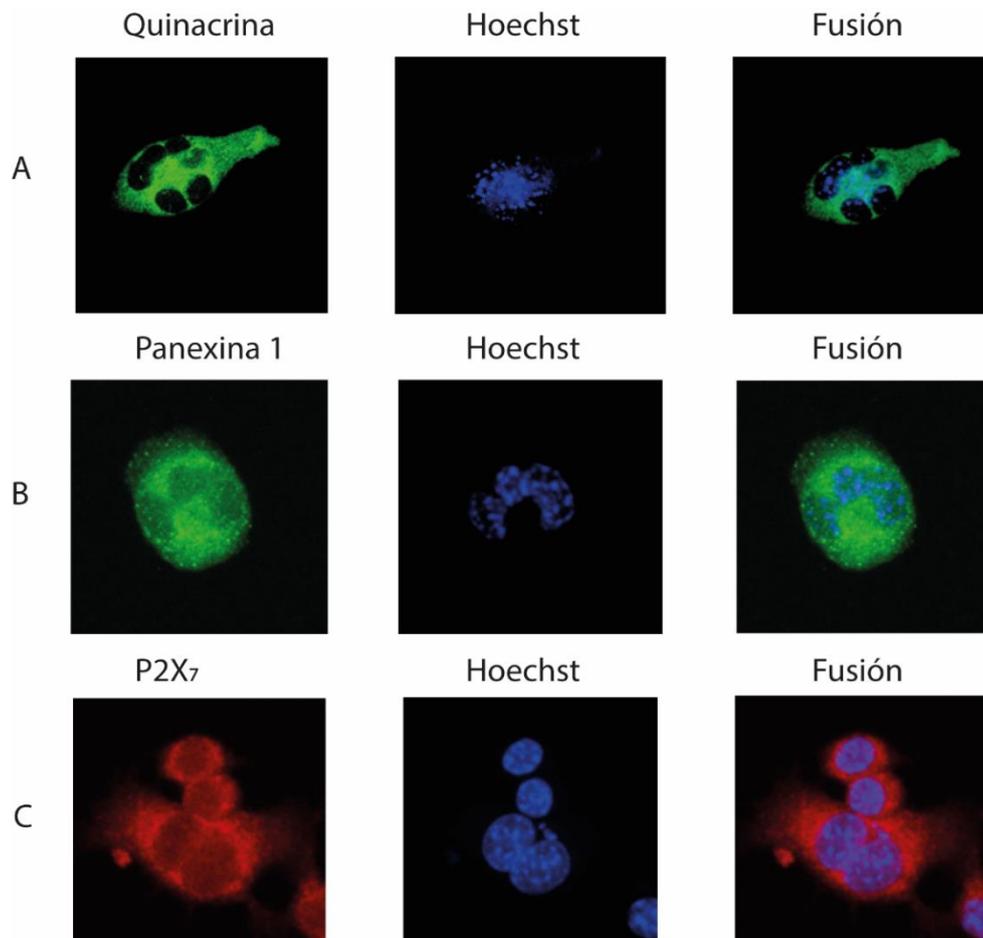


Figura 16. Inmunofluorescencia de los componentes de liberación de ATP en osteoclastos purificados. Los osteoclastos purificados fueron cultivados en portaobjetos, fijados y permeabilizados. Posteriormente, se realizó tinción con el marcador de vesículas de ATP quinacrina (A, marca verde), o se detectó Panexina 1 (B, marca verde) o receptor P2X₇ (C, marca roja) por inmunofluorescencia indirecta. Las imágenes fueron adquiridas en microscopio confocal y tienen co-tinción de núcleos con Hoescht 33342 (azul). Cada imagen es una agrupación de 7 fotos filtrando el máximo de fluorescencia en cada imagen.

4.1.7 Osteoclastos purificados liberan ATP basalmente y por estímulo mecánico a través de rutas independientes.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se midió la liberación de ATP basal y post movimiento del 37% del medio en cultivo en osteoclastos purificados por gradiente de suero. El estímulo mecánico indujo un incremento rápido de ATP extracelular, con un máximo de 3,2 veces sobre la basal luego de 15 seg-1 min y vida media cercana a los 5 min (figura 17A-B). La liberación basal de ATP se redujo en un 45% con el inhibidor farmacológico de la vía vesicular, glibenclamida 100 μ M, y en un 38% con el inhibidor de hemicanales de panexinas, carbenoxolona 5 μ M (figura 17C). La liberación basal de ATP no se modificó al bloquear receptores P2X₇ con BBG 50 nM. En cambio, la liberación máxima de ATP inducida por estímulo mecánico se redujo en un 63% con BBG 50 nM, y no fue afectada por glibenclamida ni carbenoxolona (figura 17D).

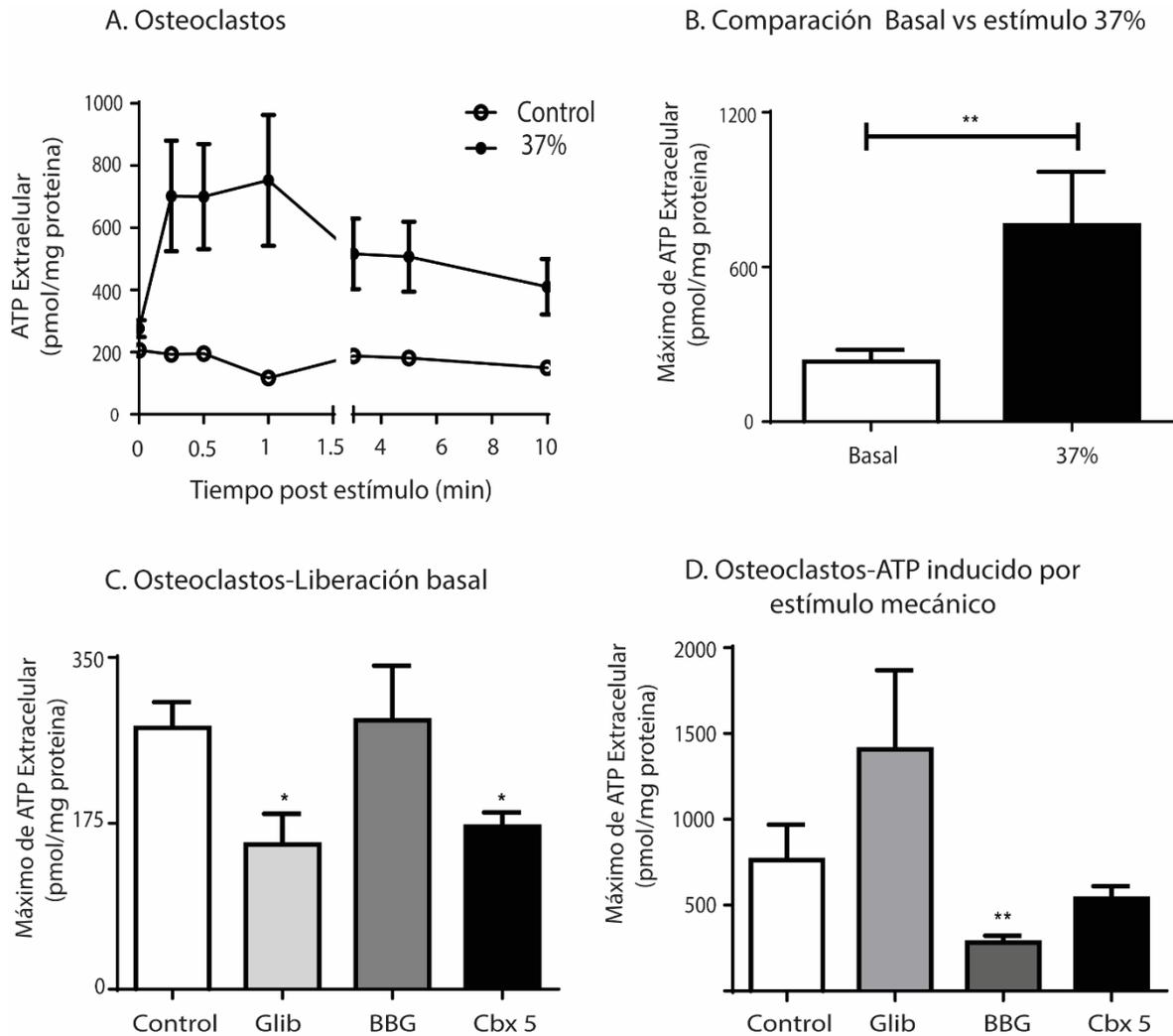


FIGURA 17. Osteoclastos purificados liberan ATP basalmente y por estímulo mecánico a través de rutas independientes. Células RAW 264.7 fueron estimuladas durante 7d con RANKL 35 ng/mL. Posteriormente, los osteoclastos fueron purificados por gradiente de suero y resembrados para evaluar la liberación de ATP basal o posterior a estímulo mecánico (movimiento de 37% del medio extracelular cada 1 seg, durante 10 seg). **A.** A distintos tiempos post-estímulo, se tomaron alícuotas del medio de cultivo y se determinaron los niveles de ATP mediante la reacción luciferina-luciferasa. Los resultados se normalizaron por mg de proteínas. La barra "control" corresponde a mediciones en ausencia de movimiento del medio. **B.** Representación de la liberación de ATP basal vs la máxima liberación de ATP post estímulo mecánico en osteoclastos purificados **C-D.** En osteoclastos purificados, se analizó el bloqueo de la liberación basal de ATP (**C**) o la máxima liberación de ATP inducida por estímulo mecánico de movimiento de medio 37% (**D**) por incubación 30 min antes y durante el ensayo con glibenclamida 100 μ M (Glib, bloqueador de liberación de ATP por vía vesicular), carbenoxolona 5 μ M (Cbx 5, bloqueador de hemicanales de panexina), o Brilliant Blue G 50 nM (BBG, antagonista de receptores P2X₇). n=5. Todos los datos son presentados como promedio \pm SEM. *: p<0.05; **: p<0.01 respecto del control, test de Kruskal-Wallis post-hoc Dunn's.

4.1.8 Osteoclastos purificados presentan mayor liberación basal de ATP y menor post movimiento del medio que cultivos celulares RAW monocito y RAW 5d RANKL.

Comparativamente, el nivel basal de ATP extracelular en osteoclastos purificados fue 2 veces mayor que el de células RAW monocitos (Figura 18A). En cambio, la máxima liberación de ATP post estímulo mecánico en osteoclastos fue 8 veces menor que en RAW monocitos y 4,5 veces menor que en RAW 5d RANKL (figura 18B). Al comparar el efecto de los bloqueadores farmacológicos de la liberación de ATP por vía vesicular o conductiva encontramos dos diferencias entre los cultivos de RAW Monocito y osteoclasto, el primero es el efecto en la liberación basal con glibenclamida donde redujo en un 50% los niveles basales de ATP extracelular en osteoclastos purificados, mientras que no tuvo efecto sobre las basales de ATP en células RAW monocito (figura 18C) y el segundo fue el efecto de BBG en la liberación de ATP inducida por estímulo mecánico, el uso de BBG en RAW monocitos presenta una reducción del 44% mientras que en osteoclastos la reducción es de 63% (figura 18D).

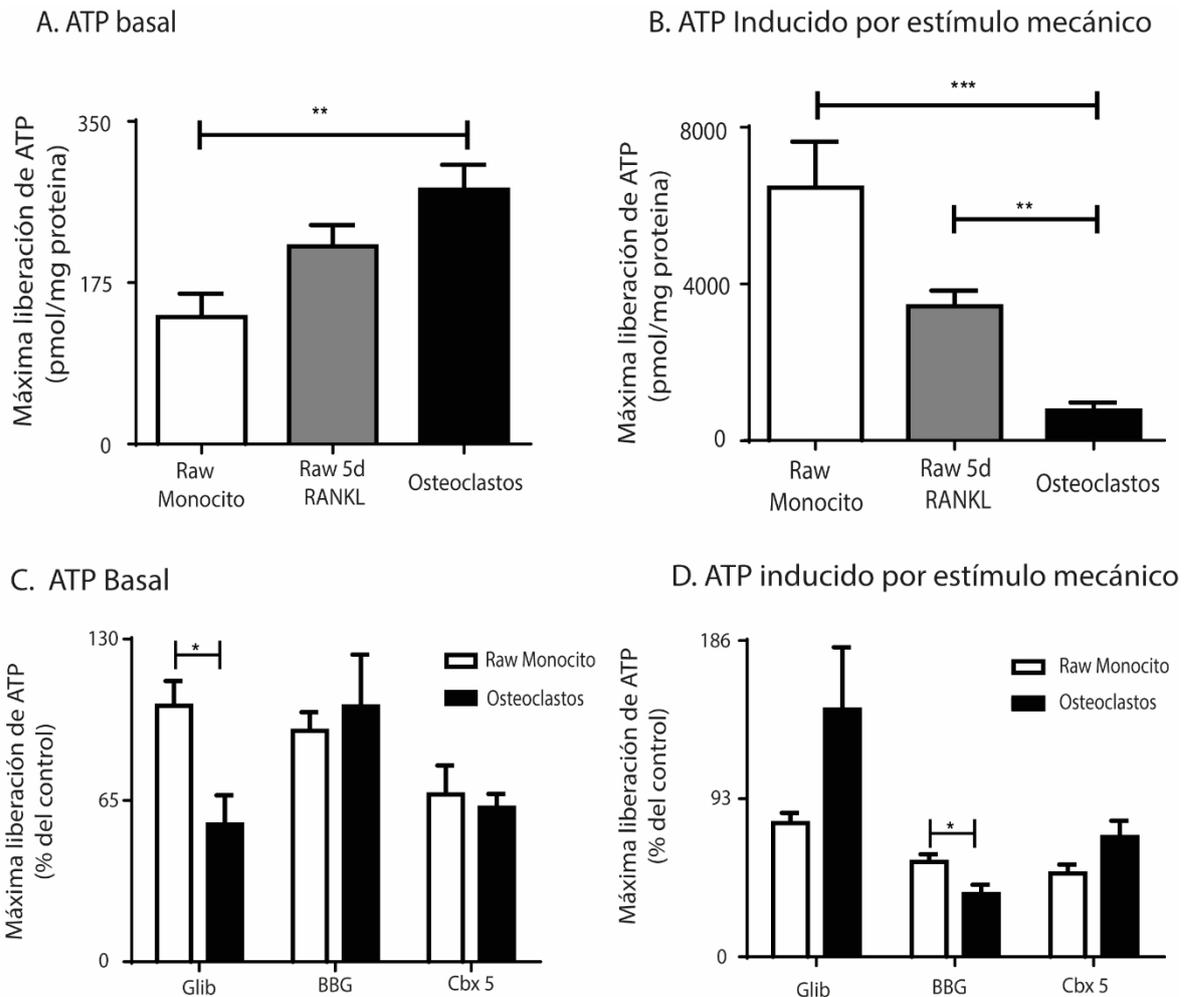


Figura 18. Osteoclastos purificados presentan mayor liberación basal de ATP y menor post movimiento del medio que cultivos celulares RAW monocito y RAW 5d RANKL. **A.** Comparación del nivel basal de ATP extracelular entre células RAW monocito, RAW 5d RANKL y osteoclastos purificados. **B.** Comparación del máximo de liberación de ATP post movimiento del medio del 37% entre células RAW monocito, RAW 5d RANKL y osteoclastos purificados. **C-D.** Comparación del efecto de distintos bloqueadores en la liberación de ATP basal (C) o inducida por estímulo mecánico (D) en células RAW monocito y osteoclastos purificados. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control, que corresponde al ATP basal (C) o inducido por estímulo mecánico (D) en ausencia de bloqueadores. n=5. Todos los datos son presentados como promedio \pm SEM. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. test de Kruskal-Wallis, seguido de la prueba post-hoc de Bonferroni para las comparaciones de liberación basal y post estímulo mecánico de ATP entre RAW monocitos, RAW 5d RANKL y Osteoclastos. test de Mann-Whitney comparando RAW monocito barra blanca y Osteoclastos con la preincubación de los diferentes inhibidores.

En resumen, los resultados de esta primera sección demuestran que osteoclastos diferenciados y purificados a partir de la línea celular RAW 264.7, responden a estimulación mecánica por movimiento del medio extracelular liberando ATP por mecanismos regulados, independientes de la lisis celular. Las vías de liberación de ATP basal son bloqueadas parcialmente al usar bloqueadores de la vía vesicular (glibenclamida) o conductiva dependiente de panexina 1 (carbenoxolona). En tanto, la liberación inducida por estímulo mecánico es bloqueada parcialmente con un inhibidor de la vía conductiva dependiente de receptor P2X₇ (Brilliant Blue G).

4.2 ATP extracelular induce la síntesis de proteínas en músculo FDB de ratón por activación de receptores P2Y asociados a la vía PI3K-Akt-mTOR.

4.2.1 ATP 100 μ M fosforila Akt en S473 en músculo completo y S6 en S(235/236). Curva de tiempo.

Considerando que ATP exógeno fue el estímulo a utilizar, se evaluó inicialmente el grado de metabolización de esta molécula en contacto con músculo FDB de ratón aislado. En contacto con músculo FDB, ATP 100 μ M presentó una disminución gradual de hasta 30% a los 15 min, manteniéndose luego relativamente estable y llegando a una metabolización de un 40% a los 90 min (Anexo 4). El modelo de músculo intacto, si bien podría dificultar el acceso del ATP exógeno a las fibras musculares (versus, por ejemplo, la utilización de un modelo de músculo semidisgregado enzimáticamente), es más semejante a la fisiología y se adecúa mejor a nuestra propuesta, pensando que el ATP liberado desde células óseas debiera acceder al músculo esquelético en el organismo a pesar de su alta complejidad estructural. Para validar el efecto de ATP exógeno en la vía Akt de músculo FDB completo, se realizó una curva tiempo-respuesta con ATP 100 μ M y se evaluó la fosforilación de las proteínas Akt en S473 y S6 (proteína río abajo de mTOR) en S(235/236). ATP 100 μ M incrementó 3 veces la fosforilación de Akt a los 7-15 min (figura 19A). Además, aumentó al doble la fosforilación de S6 a los 20 min (figura 19B).

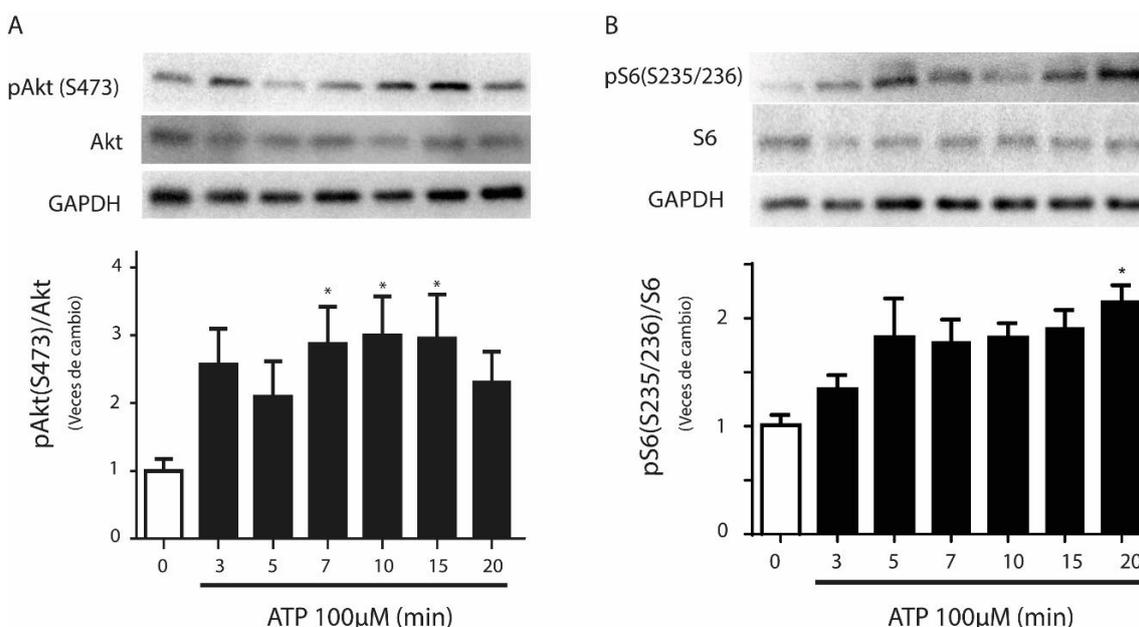


Figura 19. ATP 100 μ M fosforila a Akt en S473 y a S6 en S(235/236) en músculo completo. Músculo FDB aislado se estabilizó en *DMEM-HS* 1 % durante 2 h a 37 °C. Posteriormente, los

músculos se incubaron con ATP 100 μM por distintos tiempos (0-20 min) y se homogenizaron. Las proteínas se resolvieron por SDS-PAGE y se realizó inmunoblot con los anticuerpos indicados. **A.** Inmunoblot contra pAkt S473, Akt total y GAPDH. **B.** Inmunoblot contra pS6 S(235/236), S6 total y GAPDH. En el panel superior de cada figura se muestra una imagen representativa de un $n=5$. En el panel inferior de cada imagen se muestra el análisis densitométrico que incluye todas las repeticiones. Cada proteína fosforilada está normalizado de acuerdo a su proteína total. Todos los datos son presentados como promedio \pm SEM. *: $p<0.05$. test de Kruskal-Wallis post-hoc Dunn's.

4.2.2 ATP promueve la fosforilación de Akt en S473 de manera concentración-dependiente y activa los componentes de la vía mTOR, p70S6K y 4E-BP1 en músculo FDB aislado.

Para determinar el rango de concentración de ATP que promueve la fosforilación de Akt, se realizó una curva concentración-respuesta incubando músculos FDB con ATP (0.1 – 100 μM) por 10 min. ATP indujo fosforilación de Akt (S473) entre 1 y 100 μM , siendo 3 μM la concentración que presentó un mayor incremento (2,2 veces de aumento en la fosforilación respecto del control) (figura 20A). Teniendo en cuenta que 3 μM presentó la mayor fosforilación de Akt (S473), se evaluó con esta concentración la fosforilación de los componentes río debajo de la ruta, a distintos tiempos de estimulación. ATP 3 μM aumentó la fosforilación de mTOR (S2448) y p70S6K (T389) 1,8 y 1,7 veces, respectivamente, luego de 20 min de incubación (figura20B-C). También incrementó 1,5 veces la fosforilación de 4E-BP1 (T37/46) a los 10 min post estimulación (figura20D).

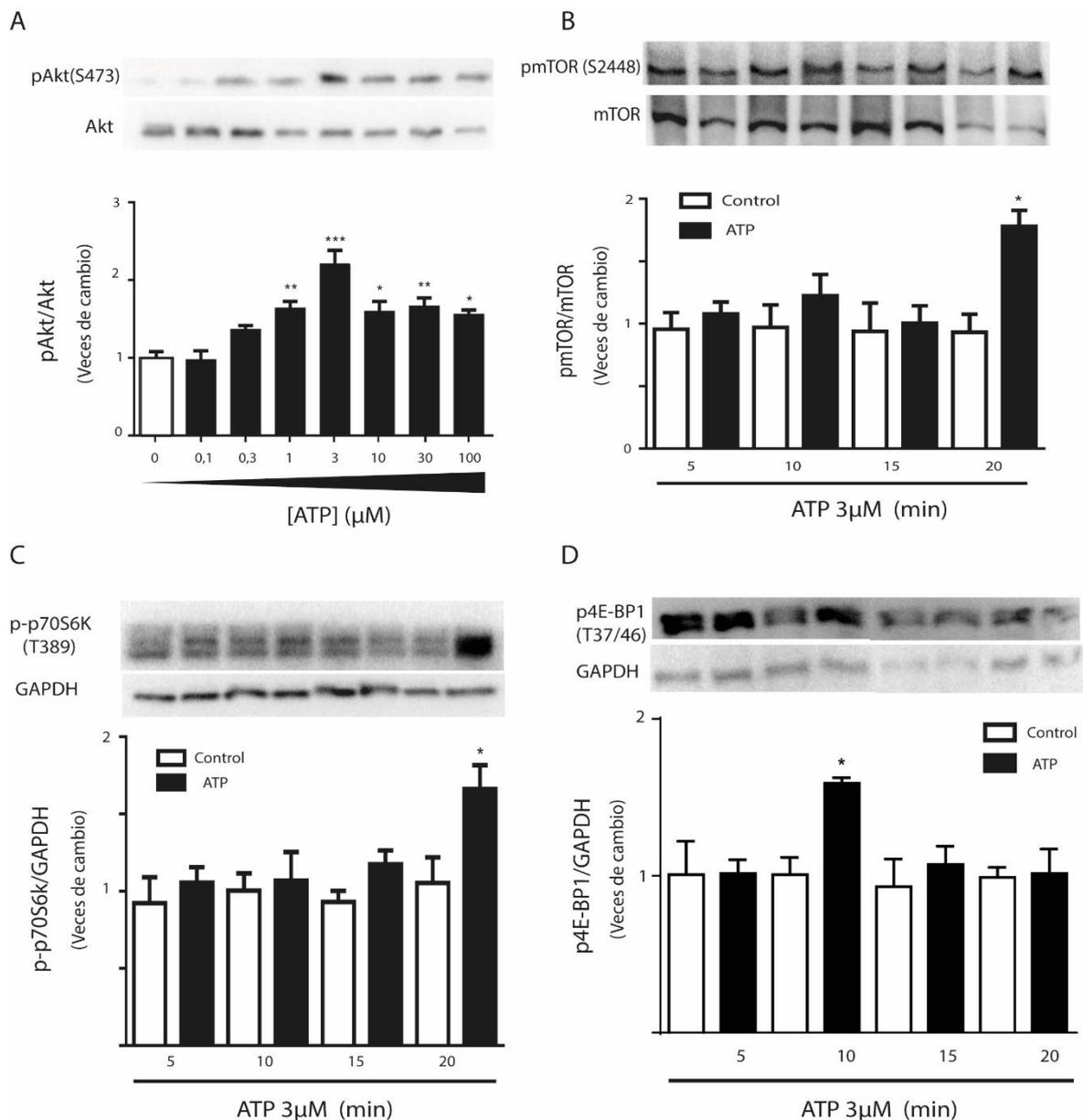


Figura 20. ATP promueve la activación de Akt de manera concentración-dependiente, y activa la ruta mTOR, p70S6K, 4E-BP1 en músculo FDB. Músculo FDB aislado se estabilizó en *DMEM-HS* 1 % durante 2 h a 37 °C. Posteriormente, los músculos se incubaron con ATP a las concentraciones y tiempos señalados y se homogenizaron. Las proteínas se resolvieron por SDS-PAGE (20 μg por carril) y se realizó inmunoblot con los anticuerpos indicados. En el panel superior de cada figura se muestra una imagen representativa de un $n=5$. En el panel inferior de cada imagen se muestra el análisis densitométrico que incluye todas las repeticiones. **A.** Inmunoblot contra pAkt S473, Akt total y GAPDH; curva concentración-respuesta de ATP (0.1- 100 μM), 10 min post estimulación. **B.** Inmunoblot contra pmTOR S2448, mTOR total y GAPDH; curva temporal (5-20 min) con ATP 3 μM . **C.** Inmunoblot contra p-p70S6K T389 y GAPDH; curva temporal (5-20 min) con ATP 3 μM . **D.** Inmunoblot contra p-4E-BP1 T37/46 y GAPDH; curva temporal (5-20 min) con ATP 3 μM . En las figuras B-D, para cada tiempo se ensayaron los músculos contralaterales de un mismo animal en ausencia (Control) o presencia (ATP) de ATP 3 μM . Todos los datos son presentados como promedio \pm SEM. *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$, test de Kruskal-Wallis post-hoc Dunn's para grafica A y test de Mann-Whitney comparando Control vs ATP en las gráficas B,C y D.

4.2.3 ATP incrementa la síntesis de proteínas en el músculo FDB.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, en que se demostró que ATP 3 μ M activa la vía Akt-mTOR-p70S6K-4E-BP1, el siguiente experimento fue medir si ATP aumenta de la síntesis de proteínas en músculo FDB. Se utilizó la técnica SUnSET de pulso y caza con puromicina para evaluar la síntesis de proteínas. Los ensayos previamente publicados con esta técnica en músculo esquelético se han realizado *in vivo* o en cultivos celulares de C2C12 o L6; nosotros estandarizamos un protocolo de medición en músculo FDB aislado. Se ensayaron diferentes tiempos de incubación con medio bajo en suero previo al ensayo (HS 1%, 2, 6 o 12 h) y se utilizó insulina 100 nM como control positivo de inducción de la síntesis proteica vía Akt. A pesar que con cualquiera de los tiempos de depleción de suero insulina incrementó de manera significativa la fosforilación de Akt (Anexo 5), sólo luego de 2 h de depleción de suero, insulina aumentó la síntesis proteica por encima del control (figura 21A). Por lo tanto, para ensayos posteriores se mantuvo la condición de depleción de suero por 2h previo a los ensayos. Posteriormente se determinó que, luego de 2h de depleción de suero, 3 μ M ATP aumento 1,41 veces la tasa de síntesis de proteínas en músculo FDB aislado (Figura 21B).

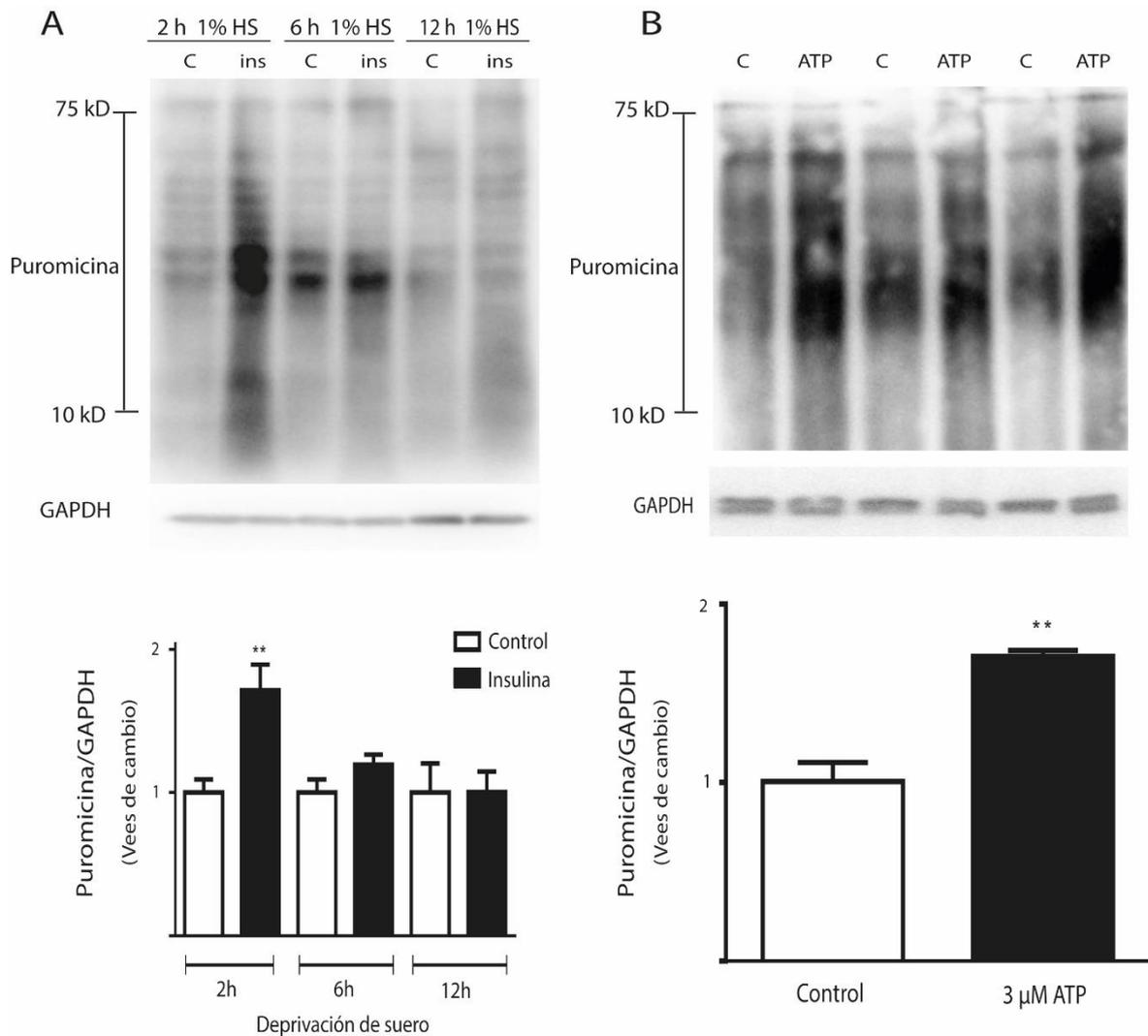


Figura 21. ATP incrementa la síntesis de proteínas en el músculo FDB. Músculos FDB aislados se incubaron en medio bajo en suero (*DMEM-HS* 1 %) durante 2, 6 o 12 h (A) o 2 h (B) a 37 °C. Posteriormente, se realizaron los tratamientos con Insulina 100 nM o ATP 3 μM durante 45 min. y se evaluó la síntesis proteica por incorporación de puromicina a las proteínas neosintetizadas (técnica de SUnSET). En el panel superior de cada figura se muestra una imagen representativa. En el panel inferior de cada imagen se muestra el análisis densitométrico que incluye todas las repeticiones. Para cada tratamiento (Insulina, ATP) se evaluó el músculo FDB de la pata contralateral en ausencia de estímulo (Control). **A.** Efecto de Insulina 100 nM en la incorporación de puromicina a músculo FDB, previo 2, 6 o 12 h de depleción de suero; n=3. **B.** Efecto de ATP 3 μM en la incorporación de puromicina a músculo FDB, previo 2 h de depleción de suero; n=5. Todos los datos son presentados como promedio ± SEM. **: p<0.01, test de Mann-Whitney comparando Control vs Insulina o ATP.

4.2.4 El incremento en la síntesis de proteínas en músculo FDB inducido por ATP 3 μM es dependiente de la vía P2-PI3K-mTOR.

Para evaluar si el aumento de la síntesis de proteínas inducido por ATP 3 μM se debe a la activación de los receptores P2-PI3K-mTOR, se utilizó suramina 100 μM (antagonista general de los receptores P2X y P2Y), LY294002 50 μM (inhibidor de PI3K) o Rapamicina 100 nM (inhibidor de mTOR) como bloqueadores de la ruta a

distintos niveles. Cada uno de estos bloqueadores anuló la síntesis de proteínas inducida por ATP extracelular (Figura 22).

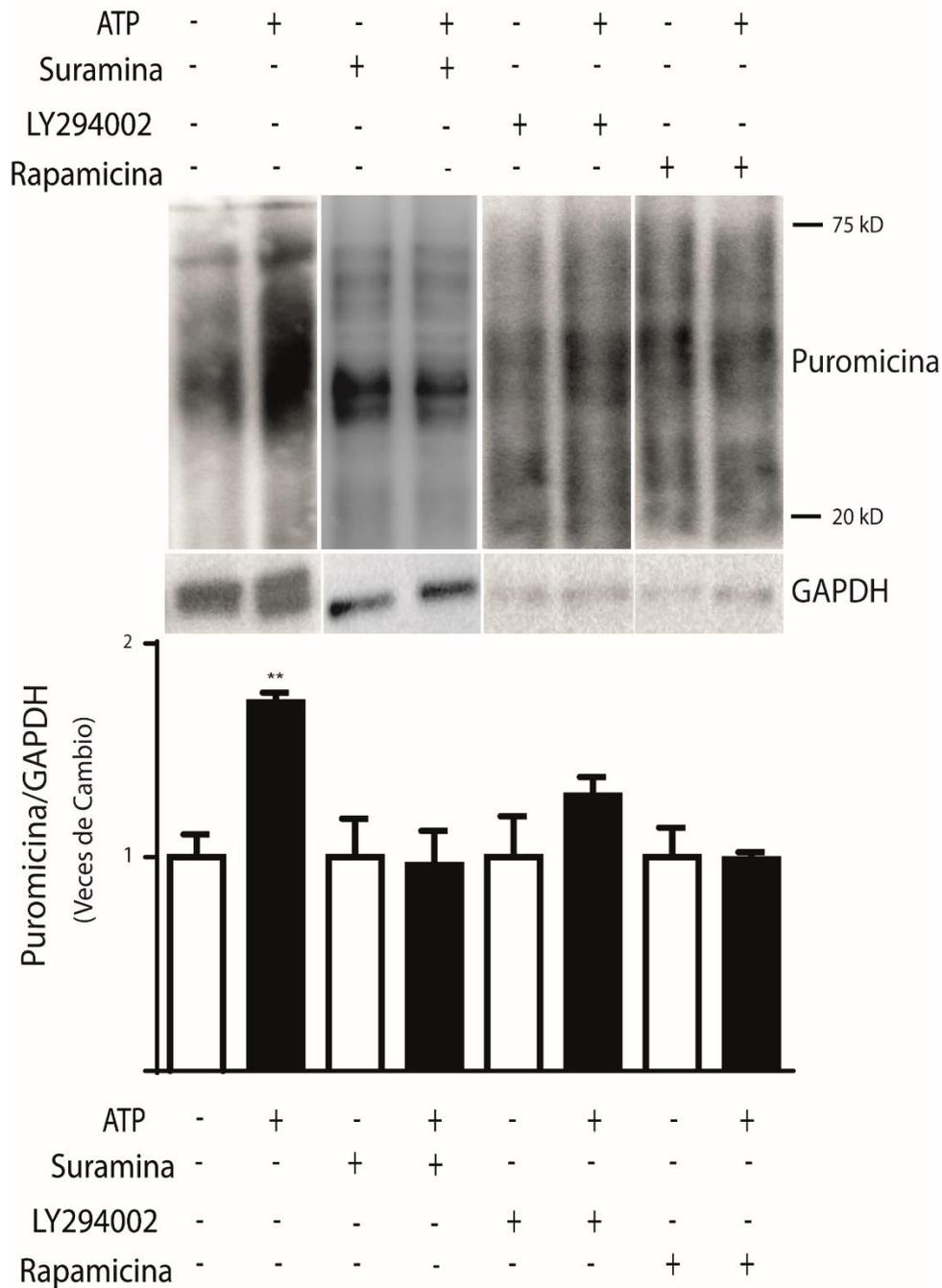


Figura 22 La síntesis de proteínas inducida por ATP 3 μ M en músculo FDB es dependiente de la vía P2-PI3K-mTOR. Músculos FDB aislados se incubaron en medio bajo en suero (*DMEM-HS* 1 %) durante 2 h a 37 °C. Posteriormente, se realizaron los tratamientos con suramina 100 μ M, LY294002 50 μ M o Rapamicina 100 nM por 30 min. antes y durante el estímulo de ATP 3 μ M y se evaluó la síntesis proteica por incorporación de puromicina a las proteínas neosintetizadas (técnica de SUnSET). En el panel superior de cada figura se muestra una imagen representativa de un n=3. En el panel inferior de cada imagen se muestra el análisis densitométrico que incluye todas las repeticiones. Las muestras (-) y (+) ATP en presencia de cada uno de los bloqueadores corresponden a músculos FDB contralaterales de un mismo animal. Todos los datos son presentados como promedio \pm SEM. **: $p < 0.01$, test de Mann-Whitney comparando Control vs ATP.

4.2.5 ATP 3 μ M no afecta la degradación de proteínas vía proteosoma.

Teniendo en cuenta que el mantenimiento de los niveles proteicos depende del balance entre las vías de síntesis y degradación, se evaluó el efecto de ATP 3 μ M en la vía ubiquitina E3 ligasa - proteosoma como una ruta principal de degradación de proteínas. Nosotros encontramos ATP 3 μ M no modifica la cantidad de proteínas poli-ubiquitinadas en lisina 48 (K48), en ausencia o presencia del inhibidor del proteosoma MG132 5 μ M (figura23).

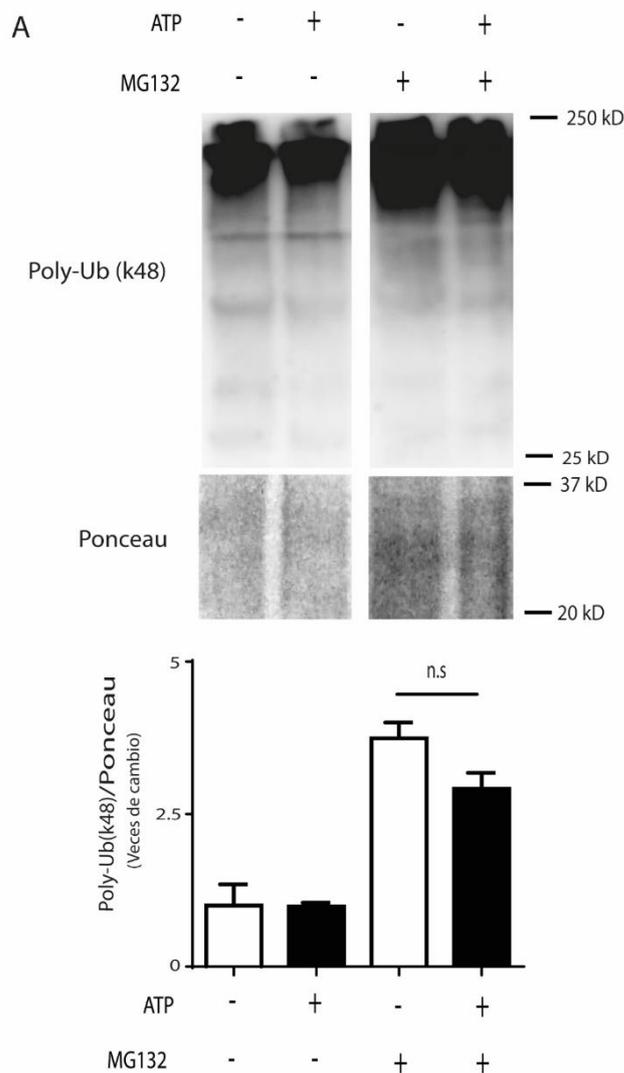


Figura 23. ATP 3 μ M no afecta la vía de degradación de proteínas vía poli-ubiquitina. Músculos FDB aislados se incubaron en medio bajo en suero (*DMEM-HS* 1 %) durante 2 h a 37 °C. Posteriormente, se realizaron los tratamientos con el inhibidor del proteosoma MG132 5 μ M por 30 min. antes y durante el estímulo de ATP 3 μ M y los músculos se homogenizaron. Las proteínas se resolvieron por SDS-PAGE (20 μ g por carril) y se realizó inmunoblot con el anticuerpo anti-poli ubiquitina (k48). En el panel superior de cada figura se muestra una imagen representativa de un n=4. En el panel inferior de cada imagen se muestra el análisis densitométrico que incluye todas las repeticiones. Las muestras (-) y (+) ATP para cada condición corresponden a músculos FDB contralaterales de un mismo animal. n=4. Todos los datos son presentados como promedio \pm SEM. n.s: no significativo, test de Mann-Whitney comparando Control vs ATP

En resumen, los resultados de esta segunda sección muestran que el ATP extracelular promueve la síntesis de proteínas a través de la activación de la vía P2-PI3K-Akt-mTOR, sin afectar la degradación de proteínas vía proteosoma en el músculo FDB de ratón.

4.3 Osteoclastos estimulados mecánicamente promueven la síntesis de proteínas en músculo esquelético a través de la liberación de ATP y activación de la vía P2Y-PI3K-Akt-mTOR.

4.3.1 Osteoclastos purificados liberan ATP en concentraciones cercanas a $3 \mu\text{M}$

Teniendo en cuenta que nuestro trabajo busca determinar si el ATP liberado por osteoclastos post estímulo mecánico (objetivo 1) podría generar incrementos de la síntesis de proteínas en músculo esquelético (objetivo 2), siendo esta una comunicación paracrina, lo primero que determinamos fue la concentración de ATP extracelular basal y post estímulo mecánico en osteoclastos purificados. Osteoclastos fueron sembrados en el compartimento superior de cámaras Transwell® de 12 mm (figura 24A), y se cuantificó el ATP en el medio extracelular tanto basal como durante 45 min posteriores a la estimulación mecánica. A nivel basal, la concentración de ATP fue de $0,064 \pm 0,021 \mu\text{M}$, que se incrementó post estímulo mecánico a valores $2,61 \pm 1,04 \mu\text{M}$ en los primeros 15 seg post estimulación, llegando a valores de $1,3 \pm 0,7 \mu\text{M}$ a los 20 min. post estimulación (figura 24 B).

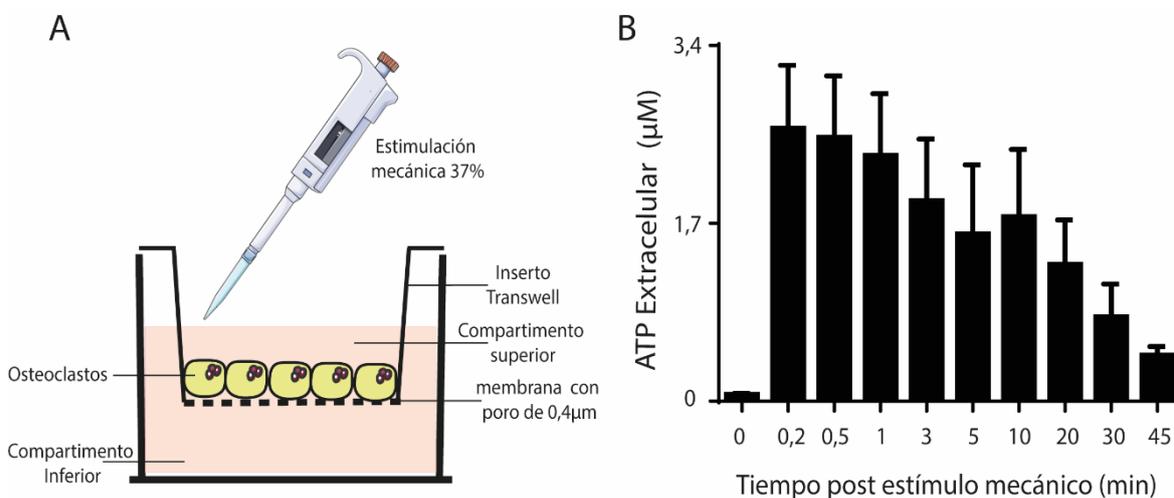


Figura 24. Los osteoclastos purificados presentan aumentos de las concentraciones extracelulares de ATP en el compartimento superior post estímulo mecánico. Células RAW 264.7 fueron estimuladas durante 7d con RANKL 35 ng/mL. Posteriormente, los osteoclastos fueron purificados por gradiente de suero y resembrados en el compartimento superior de cámaras Transwell® de 12 mm (A). Se evaluó la liberación de ATP basal o posterior a estímulo mecánico (movimiento de 37% del medio extracelular cada 1 seg, durante 10 seg). A distintos tiempos post-estímulo, se tomaron alícuotas del medio de cultivo y se determinaron los niveles de ATP mediante la reacción luciferina-luciferasa (B). Todos los datos son presentados como promedio \pm SEM.

4.3.2 En un sistema de co-cultivo, el estímulo mecánico de osteoclastos purificados incrementa la síntesis de proteínas en músculo esquelético.

Teniendo en cuenta, que las concentraciones de ATP extracelular son cercanas a las reportadas en el objetivo 2, nosotros realizamos co-cultivos, sembrando en el compartimento superior los osteoclastos purificados y en el compartimento inferior el músculo FDB aislado (figura 25A, panel derecho). En este sistema, la estimulación mecánica de los osteoclastos por movimiento del medio aumentó 2 veces la síntesis de proteínas en el músculo FDB del compartimento inferior, respecto de la condición con osteoclastos sin estimular (figura 25B, panel derecho). Como control, se realizaron cultivos sólo con músculo FDB en la cámara inferior, sin osteoclastos. En dicho sistema, el movimiento del medio en la cámara superior no modificó la incorporación de puromicina en el músculo, confirmando que este efecto no se debe a una acción directa de la perturbación del medio sobre las células musculares (Figura 25A-B, paneles izquierdos).

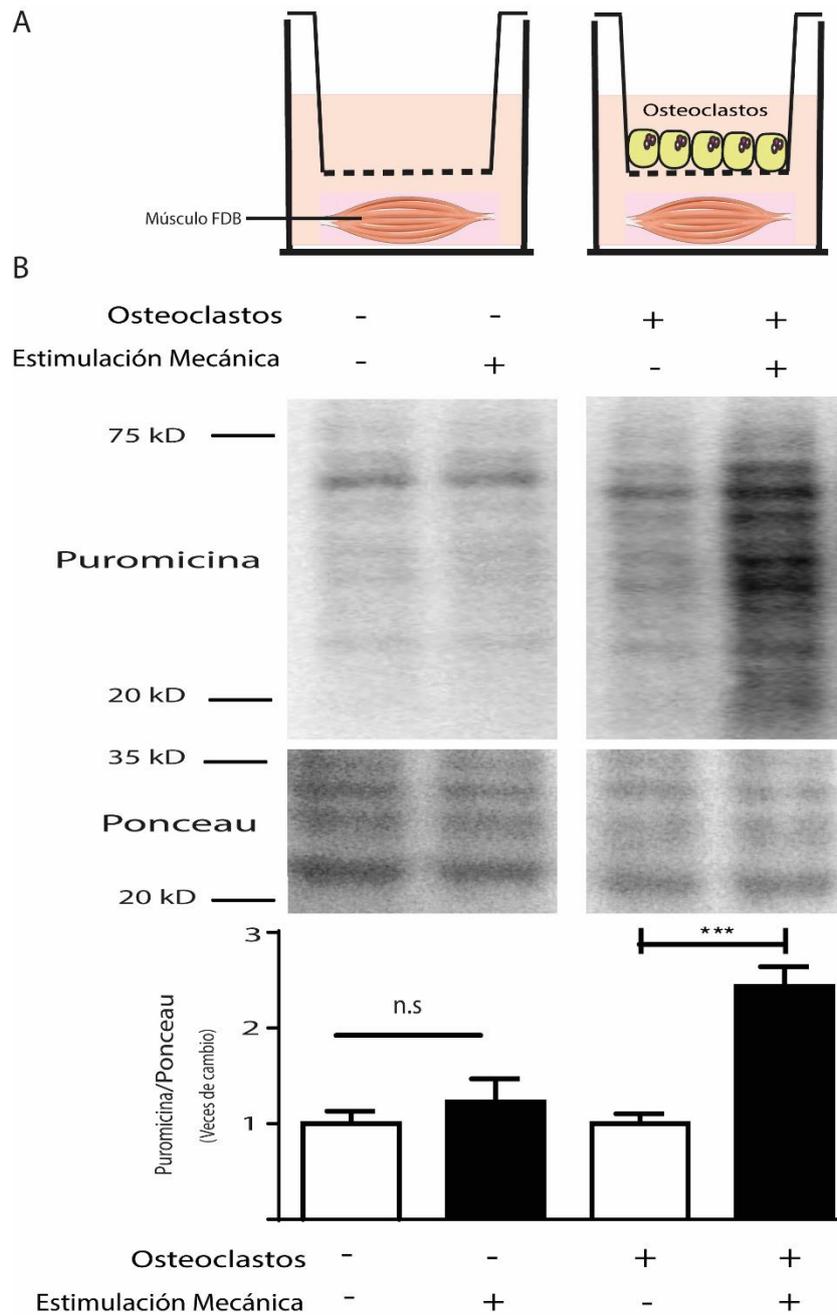


Figura 25. El estímulo mecánico en osteoclastos purificados incrementa la síntesis de proteínas en el músculo esquelético adyacente. Células RAW264.7 fueron estimuladas durante 7d con RANKL 35 ng/mL. Posteriormente, los osteoclastos fueron purificados por gradiente de suero y resembrados en el compartimento superior de cámaras Transwell® de 12 mm. En el compartimento inferior, se situó un músculo FDB aislado y estabilizado por 2h en DMEM-HS 1%. Se realizó estimulación mecánica (movimiento de 37% del medio extracelular cada 1 seg, durante 10 seg) a los osteoclastos, y se evaluó la síntesis proteica en el músculo FDB por incorporación de puromicina a las proteínas neosintetizadas (técnica de SUnSET). **A.** Diagrama del sistema de co-cultivo de osteoclastos purificados y músculo FDB de ratón. El panel izquierdo muestra el control en que se realiza estimulación mecánica en ausencia de osteoclastos en la cámara superior. El panel derecho muestra la condición experimental en que se realiza estimulación mecánica a los osteoclastos sembrados en la cámara superior. **B.** Evaluación de la síntesis proteica en músculo FDB por incorporación de puromicina. En el panel superior se muestra una imagen representativa de un n=5; En el panel inferior se muestra el análisis densitométrico que incluye todas las repeticiones. Todos los datos son presentados como promedio \pm SEM. ***: $p < 0.001$, test de Mann-Whitney comparando Control vs estimulación mecánica.

4.3.3 La síntesis de proteínas en el músculo FDB inducida por estimulación mecánica de osteoclastos es dependiente de la presencia de ATP extracelular.

Dado que la estimulación mecánica en osteoclastos purificados incrementa la liberación de ATP de éstos, pero además provoca incrementos de la síntesis de proteínas en el músculo FDB, evaluamos si el ATP extracelular es un mediador en la comunicación entre osteoclastos y células musculares. Para esto, se realizó el experimento de co-cultivo de osteoclastos y músculo FDB descrito en la figura 25A, en presencia de apirasa 5 U/ml en el medio de cultivo. Apirasa es una nucleotidasa que metaboliza el ATP hasta AMP y, por tanto, degradará el ATP que sea liberado durante el estímulo mecánico a osteoclastos. En presencia de apirasa, se anuló el aumento en la síntesis de proteínas en el músculo FDB inducido por estímulo mecánico en los osteoclastos purificados (Figura 26).

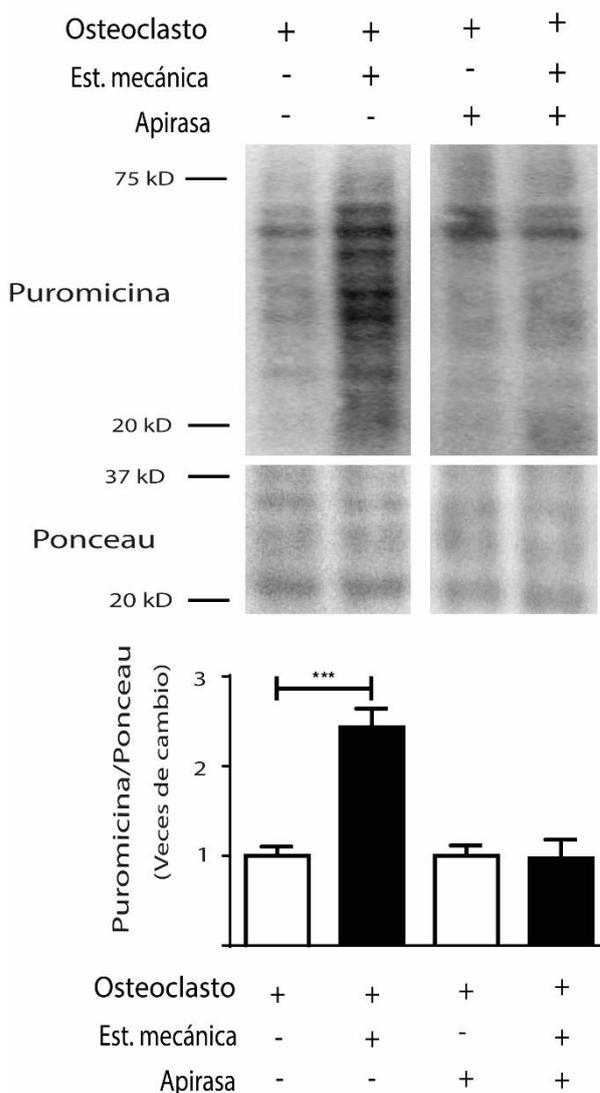


Figura 26. La síntesis de proteínas en el músculo FDB inducida por estimulación mecánica de osteoclastos es dependiente de ATP extracelular. Se realizaron ensayos de co-cultivo en cámaras Transwell® de osteoclastos purificados y músculo FDB de ratón, y estimulación mecánica por movimiento del medio, de acuerdo con lo descrito en la figura 21. El ensayo se realizó en ausencia o presencia de apirasa 5U/ml, ectonucleotidasa que metaboliza el ATP a AMP. En el panel superior se muestra una imagen representativa de un n=4; En el panel inferior se muestra el análisis densitométrico que incluye todas las repeticiones. Todos los datos son presentados como promedio \pm SEM. **: $p < 0.01$. test de Mann-Whitney comparando Control vs estimulación mecánica.

4.3.4 La síntesis de proteínas en músculo FDB inducida por estimulación mecánica de osteoclastos es dependiente de la activación de la vía P2R-PI3K-mTOR

Teniendo en cuenta que el estímulo mecánico en osteoclastos purificados incrementa la liberación de ATP el cual es relevante para el incremento de la síntesis de proteínas en el músculo FDB, nosotros evaluamos si este incremento en la síntesis de proteínas es dependiente de la activación de los receptores P2 y de la activación de la vía PI3K-mTOR. Para corroborar esta activación, se utilizaron los bloqueadores farmacológicos de esta vía descritos previamente: suramina 100 μ M, LY294002 50 μ M y Rapamicina 100 nM. Estos bloqueadores efectivamente anularon el incremento de la síntesis de proteínas en el músculo FDB post estímulo mecánico de osteoclastos purificados (figura 27).

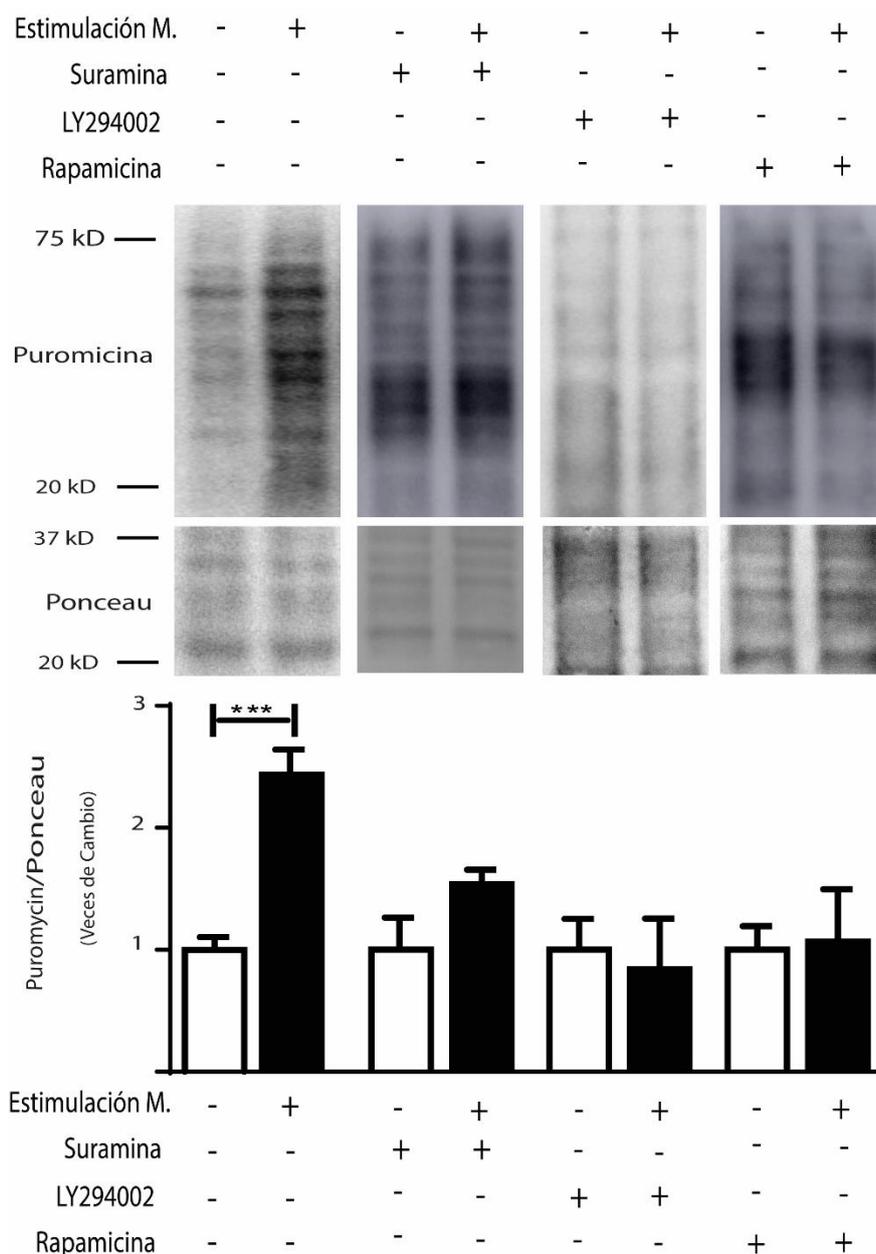


Figura 27. La síntesis de proteínas en músculo FDB inducida por estimulación mecánica de osteoclastos es dependiente de la activación de la vía P2R-PI3K-mTOR A. Se realizaron ensayos de co-cultivo en cámaras Transwell® de osteoclastos purificados y músculo FDB de ratón, y estimulación mecánica por movimiento del medio, de acuerdo a lo descrito en la figura 21. El ensayo se realizó en ausencia o presencia de suramina 100 μ M, LY294002 50 μ M o Rapamicina 100 nM. En el panel superior se muestra una imagen representativa de un n=4; En el panel inferior se muestra el análisis densitométrico que incluye todas las repeticiones. Todos los datos son presentados como promedio \pm SEM. ***: $p < 0.001$. test de Mann-Whitney comparando Control vs estimulación mecánica y los diferentes inhibidores farmacológicos.

En resumen, los resultados de esta tercera sección muestran que la estimulación mecánica de osteoclastos libera ATP al medio extracelular que, de manera paracrina, estimula la síntesis proteica de músculo FDB de ratón por activación de la vía P2-PI3K-mTOR.

5. DISCUSIÓN.

5.1 La estimulación mecánica promueve la salida de ATP desde osteoclastos.

La función de nucleótidos extracelulares (ATP, ADP, UTP, UDP) por activación de receptores de tipo P2X/P2Y se ha descrito en todos los tipos celulares que participan en la remodelación ósea, tales como osteocitos, osteoblastos y osteoclastos (Burnstock et al., 2013; Orriss et al., 2010). Dependiendo de la concentración, ubicación y temporalidad de las señales de nucleótidos extracelulares, participan en la proliferación y diferenciación de osteoblastos, promoviendo mineralización ósea (Burnstock et al., 2013; Costessi et al., 2005; Katz et al., 2011; Nakano, Addison, & Kaartinen, 2007; N. Wang et al., 2012), o promueven la actividad y diferenciación de osteoclastos, para inducir resorción ósea (Burnstock et al., 2013; Korcok, Raimundo, Du, Sims, & Dixon, 2005; Orriss et al., 2011). Estas funciones que pueden parecer antagónicas son necesarias cada vez que se requiere remodelar hueso: antes de la activación de osteoblastos para formar nuevo tejido mineralizado, es necesaria la acción de los osteoclastos para remover el tejido antiguo (Raggatt & Partridge, 2010). Por lo tanto, los nucleótidos extracelulares podrían participar en la regulación fina de la remodelación ósea. Se ha descrito, además, que el ATP extracelular es una señal fundamental durante la percepción de la carga mecánica por osteocitos; estas células utilizarían al ATP como molécula de señalización entre sí, o con células cercanas (Thi, Suadicani, Schaffler, Weinbaum, & Spray, 2013; Thompson et al., 2011).

Paralelamente, se ha demostrado que las células óseas no sólo responden a ATP, sino que pueden liberar ATP al medio extracelular en respuesta a estimulación mecánica. En osteoblastos, se reconoce a la vía vesicular como la principal ruta de salida de ATP (Romanello et al., 2005), mientras que en osteocitos prevalece la vía conductiva, a través de hemicanales de Cnx 43 (Genetos et al., 2007).

En osteoclastos se ha reportado la expresión de diferentes subtipos de receptores purinérgicos, tales como P2X₁, P2X₄, P2X₇, P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ y P2Y₁₁ (Buckley, Hipskind, Gartland, Bowler, & Gallagher, 2002). Se ha reportado que el ATP extracelular induce el incremento transitorio de Ca²⁺ citosólico (Yu & Ferrier, 1993), así como la diferenciación y actividad de osteoclastos de ratón (Orriss, 2015). Un elemento central en los estudios de señalización purinérgica en

osteoclastos ha sido el receptor P2X₇, cuya activación se ha asociado a la reorganización del citoesqueleto en la zona de sellado, la liberación de vesículas en la laguna de resorción y la translocación de NFκB (Orriss, 2015). A pesar de la gran cantidad de efectos de las señales purinérgicas en los osteoclastos, no se ha abordado la posibilidad de una liberación de ATP basal o inducida por estímulo mecánico desde estas células. Se ha hipotetizado que los osteocitos y los osteoblastos son la fuente de ATP extracelular que estimularía de manera paracrina a los osteoclastos (Hoebertz et al., 2003; Orriss et al., 2010).

En el presente trabajo de investigación nos propusimos investigar si osteoclastos pudieran ser un componente de liberación de ATP adicional en el sistema. Encontramos que osteoclastos diferenciados a partir de monocitos de la línea celular RAW264,7 y purificados a partir de gradientes de suero, presentan vesículas de ATP y receptores P2X₇, como previamente se había reportado (Brandao-Burch et al., 2012). Adicionalmente demostramos la expresión de canales de Pnx1. Los estudios farmacológicos demostraron que los osteoclastos purificados liberan basalmente ATP al medio extracelular de forma controlada a través de la vía vesicular y la vía conductiva (dependiente de Pnx1). Un punto importante, es que en cultivos de células RAW 5d RANKL no se encontró inhibición de la liberación basal usando bloqueadores de la vía vesicular o de componentes descritos para la vía conductiva (Cnx, Pnx, receptor P2X₇) al igual que sucede con las células RAW monocitos como previamente se había reportado (Brandao-Burch et al., 2012). Esto sugiere que, en estados de monocitos o estadios previos de osteoclastos, como pre-osteoclastos o pro-osteoclastos, podrían existir vías de liberación basal de ATP distintas a las analizadas. Otro hallazgo importante de este trabajo fue determinar que en cultivos de osteoclastos purificados la estimulación mecánica incrementa 3,5 veces los niveles de ATP extracelular, desde los 15 seg post estímulo. Esta liberación inducida por un flujo turbulento se inhibe parcialmente con el bloqueo farmacológico de los receptores P2X₇, al igual que se observa en los cultivos de RAW monocitos y RAW 5d RANKL. Estos resultados indican que tanto monocitos, pre-osteoclastos, pro-osteoclastos y osteoclastos maduros, un receptor fundamental en la liberación de ATP post estímulo mecánico es el receptor P2X₇. En células RAW monocitos y RAW 5d RANKL se encontró que paralelamente la

actividad de canales de Pnx1 es necesaria para la liberación de ATP inducida por estímulo mecánico.

Aunque en este trabajo no estudiamos el efecto autocrino de la liberación de ATP desde los osteoclastos purificados, será interesante revisar en futuras investigaciones si la liberación de ATP a través de los receptores P2X₇ inducida por estimulación mecánica es una señal autocrina importante para activar otros tipos de receptores purinérgicos que permitan incrementar la diferenciación y actividad de resorción por parte de los osteoclastos.

Un punto interesante es que los tres tipos de células que regulan la masa ósea (osteocitos, osteoblastos y osteoclastos) presentan incrementos en la liberación de ATP post estimulación mecánica, la cual se presenta a nivel del hueso en el movimiento de fluido a través del sistema laguno-canalicular (Fritton & Weinbaum, 2009; Price et al., 2011). Esto permitiría durante ciclos de carga incrementos del movimiento del medio, el cual llevará a incrementos de la liberación de ATP que podría ser fundamental en el mantenimiento de la estructura y función ósea.

Otro punto importante de análisis es el mecanismo de mecanotraducción que presenta el osteoclasto al movimiento del medio extracelular, en estudios en osteoblastos se ha hipotetizado que el movimiento del medio activa canales de calcio mecano-sensibles, los cuales llevan a una despolarización celular permitiendo la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje que provoca la liberación de ATP por vía vesicular y por vía conductiva (Thompson et al., 2012). En nuestro estudio, observamos que la inhibición farmacológica del receptor P2X₇ genera una inhibición parcial de la liberación de ATP en osteoclastos, lo cual deja dos posibles explicaciones, la primera es que este receptor P2X₇ sirva como un canal mecano-sensible, el cual al ser activado por el estímulo mecánico genere incrementos de las concentraciones de calcio activando ambas vías de liberación de ATP (vesicular y conductiva); La segunda posibilidad es que el receptor P2X₇ se active por la estimulación mecánica y permita la liberación de ATP a través de él, esto significa que el receptor cumpliría una acción dual de sensar el estímulo mecánico pero además servir de canal que permitiera la liberación de ATP, sería de gran interés fisiológico estudiar en futuros trabajos el mecanismo de

mecanotraducción que lleva a los incrementos de la liberación de ATP en este tipo celular.

Otro aporte de este trabajo en el estudio de las células óseas es el estudio de la mecanotransducción del osteoclasto. En estudios se ha considerado que los osteocitos son las células responsables de la mecanotransducción a nivel óseo, y actualmente hay estudios que evidencia que los osteoblastos también presentan respuestas ante el movimiento del medio, pero además, en nuestro trabajo encontramos que osteoclastos también pueden generar respuestas ante estímulos mecánicos, estos resultados junto a el estudio que encontró que los osteoclastos generan oscilaciones de calcio intracelular post estímulo mecánico (Li et al., 2018) al igual que sucede con los osteocitos y los osteoblastos, permite entender que todas las células de remodelación ósea presentan capacidad de mecanotransducción. Un punto interesante de estudiar a futuro es si estas oscilaciones de calcio intracelulares mediadas por el movimiento del medio se da por activaciones autocrinas por la liberación de ATP y determinar si los canales calcio mecanosensibles que se han reportado en los osteoclastos STIM1 y TRPV4 (Li et al., 2018) sean importantes en la liberación de ATP post estímulo mecánico.

5.2 ATP extracelular promueve la síntesis de proteínas en músculo esquelético por activación de la vía P2Y-PI3K-Akt-mTOR.

Previamente se ha reportado que las células musculares esqueléticas expresan múltiples subtipos de receptores purinérgicos P2X/P2Y (Buvinic et al., 2009), que participan como mediadores entre la despolarización de la membrana plasmática y la expresión de genes (Buvinic et al., 2009), promueven la translocación de GLUT4 y captación de glucosa (Osorio-Fuentealba et al., 2013), activan vías anti-apoptóticas (Valladares et al., 2013) y regulan la producción de ROS (Diaz-Vegas et al., 2015).

En otros tipos celulares, tales como fibroblastos, neuronas, células epiteliales humanas y células mesangiales, se ha demostrado que la señal purinérgica activa la vía PI3K-Akt (Bilbao et al., 2010; Gerasimovskaya et al., 2005; Hu et al., 2010; Huwiler et al., 2002; Katz et al., 2011) y mTOR-p70S6K (Gerasimovskaya et al., 2005; Hu et al., 2010), conduciendo a efectos anti-apoptóticos (Huwiler et al., 2002),

proliferación (Bilbao et al., 2010; Gerasimovskaya et al., 2005; Katz et al., 2011) y recuperación de lesiones neuronales (Hu et al., 2010).

En el presente trabajo demostramos que en músculo FDB aislado de ratones adultos, el ATP extracelular incrementa la fosforilación de Akt(S473) a los 7-15 min, al igual que se reportó en cultivo primario de fibroblastos bovinos derivados de adventicia de arteria pulmonar (Gerasimovskaya et al., 2005). Además, encontramos que esta respuesta se induce a concentraciones entre 1 μ M y 100 μ M, al igual que en la línea de células epiteliales humanas MCF-7 (Bilbao et al., 2010). La máxima fosforilación de Akt ocurre con ATP 3 μ M. Este dato permite sugerir la participación de receptores de tipo P2Y en este proceso. Esto debido a que los receptores P2Y se activan con un rango de concentraciones de ATP que va desde nM hasta μ M bajo, mientras que los receptores de tipo P2X requieren concentraciones de ATP en el rango de μ M a mM para su activación (Burnstock, 2014). Considerando que en fibras aisladas de músculo FDB de ratón hemos demostrado que el receptor P2Y₂ es el subtipo mayormente expresado (Fernandez-Verdejo et al., 2014), éste podría ser el receptor intermediario entre el ATP extracelular y la activación de Akt. Como refuerzo a este punto, y considerando que el receptor P2Y₂ presenta un rango de potencia equivalente para ATP y UTP, demostramos que UTP 3 μ M induce 1,78 veces incremento en la síntesis de proteínas en músculo FDB aislado (Anexo 6). Este punto deberá ser confirmado a través del uso del antagonista competitivo selectivo para el receptor P2Y₂, AR-C 118925XX (Tocris, Reino Unido), o por electroporación directa de los músculos con un shARN para el receptor P2Y₂.

Analizando los posibles efectos río abajo de la fosforilación de Akt, estudiamos las fosforilaciones de mTOR (S2448), p70S6K(T389) y 4E-BP1(T37/46) en presencia de ATP 3 μ M. Demostramos que mTOR y p70S6K incrementan su fosforilación 1,8 veces a los 20 min, mientras que la proteína 4E-BP1 se fosforila 1,5 veces 10 min. post estimulación. Esta activación prematura de 4E-BP1 ha sido reportada en otros estudios, en las cuales se demostró que aparte de ser activada por mTOR, puede activarse directamente por Akt (Gingras et al., 1999; Tee et al., 2002). Esto último sería una posibilidad, teniendo en cuenta que Akt se fosforila desde los 7 min.

Considerando que se ha descrito que la ruta PI3K-Akt-mTOR promueve la supervivencia y crecimiento del músculo esquelético (Schiaffino et al., 2013), evaluamos si ATP 3 μ M impacta la tasa de síntesis proteica de músculo FDB aislado. Demostramos que la incubación del músculo completo con ATP 3 μ M aumenta en 1,42 veces la incorporación de puromicina mediante la técnica SuNSET, que es un indicador del nivel de proteínas neo-sintetizadas. Este efecto fue anulado cuando se pre-incubó el músculo con los bloqueadores farmacológicos suramina, LY294002 y rapamicina, lo que sugiere que el incremento de la tasa de síntesis de proteínas inducido por ATP exógeno es dependiente de la vía P2-PI3K-mTOR, al igual que fue descrito en fibroblastos (Gerasimovskaya et al., 2005).

Teniendo en cuenta que el mantenimiento de la masa muscular depende del balance de los procesos anabólicos (síntesis de proteínas) y catabólicos (degradación de proteínas) es necesario para futuros estudios del efecto del ATP en la masa muscular estudiar su efecto en las vías de degradación. El proceso de degradación de proteínas en el músculo esquelético depende de dos procesos, el sistema ubiquitin-proteosoma y el sistema autofagia-lisosoma (Schiaffino et al., 2013; Schiaffino & Mammucari, 2011). La activación de ambas vías proteolíticas es regulada transcripcionalmente a través de la expresión de genes relacionados con la atrofia conocidos como atrogenes (Atrogina-1 y MuRF1), los cuales a su vez son dependientes de las proteínas FoxO, las cuales presentan regulación negativa por Akt (Schiaffino et al., 2013; Schiaffino & Mammucari, 2011). Nosotros evaluamos si ATP 3 μ M podía tener un efecto sobre la vía E3 ubiquitina ligasa-proteosoma, descrita como la principal ruta de degradación de proteínas en músculo esquelético (Bodine et al., 2001; Leger et al., 2006; Schiaffino & Mammucari, 2011). En condiciones control, ATP 3 μ M no indujo cambios en la cantidad de proteínas poli-ubiquitinadas en lisina 48 (K48). Para descartar que la ausencia de efecto se debiera a un funcionamiento exacerbado de los proteosomas, degradando las proteínas poli-ubiquitinadas antes de su posible detección, se repitió el ensayo en presencia del inhibidor del proteasoma MG132 5 μ M. En esas condiciones efectivamente se aprecia la acumulación de mayores cantidades de proteínas poli-ubiquitinadas en condiciones basales. Sin embargo, ATP 3 μ M no indujo cambios significativos en los niveles de éstas. Cabe mencionar, de todas formas, que en los 4 experimentos independientes realizados en presencia del inhibidor del

proteosoma, se detecta una disminución en la marca de proteínas poli-ubiquitinadas respecto de la marca basal, aunque no es suficiente para dar significancia estadística con el test analizado. Para validar este punto es necesario aumentar el número de ensayos. Pero además también sería de gran interés fisiológico estudiar el efecto del ATP extracelular sobre la fosforilación de las proteínas FoxO y su efecto en la producción de atroginas (Atrogin-1 y MuRF1) y en el sistema autofagia-lisosoma para tener una caracterización completa de los efectos del ATP en la masa muscular.

El rol del ATP exógeno como inductor de los niveles proteicos sugiere que podría ser una molécula encargada de mantener la masa muscular basal de manera trófica, o promover hipertrofia muscular en condiciones fisiopatológicas. Considerando que el ATP es una molécula ubicua, liberada por múltiples componentes celulares del sistema musculoesquelético (fibras musculares, células óseas, células de vasos sanguíneos, fibroblastos del tejido conectivo) (Burnstock et al., 2013), podría participar en la regulación fina de la masa muscular. Estas evidencias junto a las ya existentes de que ATP extracelular genera modificaciones en genes tempranos (c-fos), tardíos (interleuquina 6) (Buvinic et al., 2009) y las modificaciones en la expresión de genes relacionados con la plasticidad como sucede con la troponina I (Jorquera et al., 2013), abren una nueva área de interés clínico en patologías tales como distrofias musculares, en condiciones como la pérdida de masa muscular durante el envejecimiento (sarcopenia), o en procesos adaptativos relacionados con el uso/desuso muscular. Aparte de su relevancia clínica, conocer los procesos que controlan la masa muscular es un blanco atractivo en el área de fisiología del ejercicio y el entrenamiento de alto rendimiento.

5.3 ATP liberado por osteoclastos aumenta de manera paracrina la síntesis de proteínas en músculo FDB de ratón.

Se han reportado fuertes asociaciones entre el tamaño del músculo y del hueso adyacente a lo largo de la vida, en el cual un mayor tamaño muscular se relaciona de forma consistente con una mayor circunferencia perióstica (Novotny et al., 2015). Durante muchos años esta relación positiva se justificaba por la comunicación mecánica entre el músculo y el hueso, en que el músculo a través de la contracción

genera estimulación mecánica sobre el hueso, regulando su masa (Brotto & Bonewald, 2015; Maurel et al., 2017; Novotny et al., 2015).

Diversas patologías que llevan a una disminución de la actividad muscular como inmovilizaciones, reposo prolongado en cama o hipogravedad durante viajes espaciales, presentan disminuciones tanto de la masa muscular como de la masa ósea (Brotto & Bonewald, 2015; Maurel et al., 2017; Novotny et al., 2015). A su vez, durante el envejecimiento, los músculos disminuyen su masa y pierden la capacidad de generar fuerza (sarcopenia), lo que se asocia con una pérdida de densidad y fuerza ósea (osteoporosis) (Brotto & Bonewald, 2015; Burr, 1997; Cianferotti & Brandi, 2014; Kaji, 2014; Maurel et al., 2017; Novotny et al., 2015).

Sin embargo, en los últimos años, se ha demostrado que el músculo libera diferentes moléculas (denominadas mioquinas) que tienen efectos a nivel óseo, tales como miostatina, irisina e interleuquinas. Paralelamente, las células óseas liberan moléculas (denominadas osteoquinas) capaces de regular la homeostasis de las fibras musculares, tales como osteocalcina, prostaglandina E2 y Wnt-3a. Esto ha llevado a establecer el concepto de comunicación bioquímica o conversación cruzada entre ambas estructuras (Brotto & Bonewald, 2015; Cianferotti & Brandi, 2014; Kaji, 2014; Maurel et al., 2017; Tagliaferri et al., 2015).

Considerando que el ATP es una molécula versátil, que puede ser liberada tanto desde células óseas como musculares y cumplir efectos en ambas, estimamos que es un blanco interesante como posible comunicador de señales hueso-músculo, ya sea directa o indirectamente. En el presente trabajo hemos demostrado que la estimulación mecánica promueve salida de ATP desde osteoclastos purificados. Paralelamente, demostramos que el ATP exógeno promueve la síntesis proteica en músculo FDB aislado. La aproximación siguiente fue evaluar si la estimulación mecánica de osteoclastos en un sistema de co-cultivo en cámaras Transwell® con músculo esquelético, era capaz de promover síntesis proteica a través del ATP liberado. Con estos ensayos, sumados al bloqueo farmacológico de distintos puntos de la ruta, demostramos que efectivamente la estimulación mecánica de osteoclastos purificados aumenta la síntesis proteica en el músculo FDB, a través de la liberación de ATP al medio extracelular y activación de la vía de señalización receptores P2-PI3K-mTOR. Es interesante destacar que el uso de apirasa, que

degrada el ATP liberado al medio extracelular, bloquea totalmente la inducción de síntesis de proteínas en músculo inducida por estimulación mecánica de osteoclastos. Esto sitúa al ATP como un mediador fundamental y relevante del proceso.

Otra molécula derivada de células óseas que tiene un efecto demostrado sobre el mantenimiento de la masa muscular es la osteocalcina, liberada por los osteoblastos durante la formación ósea (Mera, Laue, Ferron, et al., 2016; Mera, Laue, Wei, Berger, & Karsenty, 2016). Por tanto, es probable que, durante la remodelación ósea, ya sea normal o exacerbada por procesos de daño/reparación, tanto osteoclasto como osteoblastos generen moléculas que regulen la estructura y función muscular.

Cuando consideramos al ATP como una molécula de comunicación entre células óseas y musculares, hay que tener presentes dos factores importantes:

1. El paso del ATP a través de las diferentes barreras anatómicas que se presentan desde el hueso hasta la llegada a la fibra muscular, donde la más importante en nuestro modelo es el periostio, ya que las fascias musculares como epimisio, perimisio y endomisio están presentes en nuestro modelo experimental. El periostio es una barrera de aproximadamente 60 μm de espesor en ratón (Lai et al., 2014), que comprende fibras de colágeno y elastina. Su estructura es suave e hiperelástica, lo que confiere al hueso la capacidad mecánica de absorber más energía (Knothe Tate, Yu, Jalilian, Pereira, & Knothe, 2016). Se ha determinado que el periostio es un tejido semi-permeable. Debido a la densidad de tejido conectivo presente, la tasa de transporte de moléculas es dependiente de su peso molecular. El trabajo de Lai et al. estimó la velocidad de traspaso a través del periostio de moléculas de peso molecular conocido. Así, demostraron que fluoresceína (346 Da) tenía un tiempo de paso de 9.9 seg, mientras que dextrano (3000Da) tenía un tiempo de paso de 67.7 seg y el dextrano-10000 Da tenía un tiempo de penetración de 26 min (Lai et al., 2014). De esta forma estimaron que una molécula como PGE₂, de 376 Da, presentaría un tiempo de traspaso de 10 seg, mientras que moléculas con mayor peso molecular como el factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF-1), peso molecular de 7600 Da tendría un tiempo de penetración de 13 min (Lai

et al., 2014). Considerando los datos anteriores, el ATP, que tiene un peso molecular de 551.2 Da, tendría un tiempo de penetración a través del periostio cercano a los 10-20 seg. En los ensayos de liberación de ATP desde osteoclastos por estímulos mecánicos, la vida media del ATP liberado fue cercana a los 10 min, donde se encontró concentraciones de ATP $1,75 \pm 1,1 \mu\text{M}$. En ensayos de concentraciones altas de ATP (100 μM) en presencia de músculo FDB aislado, la vida media del ATP exógeno fue mayor a 90 min. En un estudio previo en miotubos derivados de ratas neonatas, se demostró que el ATP liberado por estimulación eléctrica (20Hz, 270 pulsos, 1 mseg cada uno) tenía una vida media cercana a los 30 min (Buvinic et al., 2009). Todos estos datos sugieren que, pese a que la velocidad de metabolización del ATP depende de la concentración presente, y de la cantidad y tipo de nucleotidasas expresadas en cada tejido, su vida media en contacto con células/tejidos es del orden de 5 min - 1 h, lo que sería suficiente para permitir su paso a través del periostio. Un punto que es relevante y es interesante abordar en otros estudios, es la liberación de ATP por la red laguno-canalicular, esta red que está altamente organizada en el hueso y está formado por los 23 trillones de osteocitos y con una superficie 215m^2 en el cuerpo humano (Buenzli & Sims, 2015) puede ser una vía relevante en la comunicación paracrina entre las células de remodelación ósea y el musculo esquelético.

2. La cantidad de osteoclastos presentes en condiciones fisiológicas en la región cortical del hueso, que es la región más cercana al músculo. Teniendo en cuenta un estudio realizado en rata, la cantidad de osteoclastos a nivel cortical es dependiente del tipo de hueso analizado. En hueso calcáneo encontraron en promedio 31 osteoclastos / mm^2 , mientras que la tibia presentó 43 osteoclastos / mm^2 (Bolon, Morony, Cheng, Hu, & Feige, 2004). Se debe considerar que la cantidad de osteoclastos puede variar en condiciones patológicas, como artritis, en los cuales el promedio se puede incrementar de 43 a 849 osteoclastos / mm^2 en la tibia (Bolon et al., 2004), o en situaciones como irradiación (Willey et al., 2008) o disminución de los niveles de estrógeno circulantes (Jilka et al., 1992). Nosotros, en nuestro modelo experimental sembramos en promedio 6575 osteoclastos / mm^2 , los cuales generaban liberaciones de ATP extracelular post estímulo mecánico de $2,6 \mu\text{M}$. Esta cantidad de osteoclastos se han reportado en procesos de artrosis en la médula ósea de huesos largos (Bolon et al., 2004),

sin embargo, estos resultados sugieren que, en condiciones normales, se requerirá de la liberación de ATP por parte de otras células óseas como osteocitos y osteoblastos para generar la liberación de ATP suficiente para la activación de la síntesis de proteínas musculares por la vía P2-PI3K-mTOR.

Un punto importante para tener en cuenta es que a nivel fisiológico durante la contracción muscular muchas células cercanas al músculo esquelético liberan ATP al medio extracelular como son la motoneurona (Silinsky & Redman, 1996), las células endoteliales vasculares (Andersen & Saltin, 1985) y las mismas fibras musculares esqueléticas (Buvinic et al., 2009). Esto sugiere que la contracción muscular, que genera flujo laguno-canalicular en el hueso, provocaría la liberación de ATP extracelular desde múltiples tipos celulares del sistema musculoesquelético, que participarían en la mantención de la masa y homeostasis de músculos y huesos. Esto podría explicar en parte que, en ausencia de actividad muscular o de carga sobre el hueso, estas vías no se activen y promuevan un desbalance entre las vías de síntesis y degradación de proteínas en el músculo, dando cuenta de la atrofia por desuso.

Cabe mencionar que, igualmente, una posibilidad es que el ATP liberado desde osteoclastos no sea el mediador directo de la inducción de síntesis proteica en las células musculares, sino que actúe promoviendo la liberación de otros factores desde osteoclastos, en mayores cantidades, de mayor estabilidad o mayor potencia. Ese punto no se puede resolver con los resultados de nuestro trabajo. Sólo podemos confirmar que el ATP liberado desde osteoclastos es un mediador relevante, pero no que actúa de manera directa.

Por lo tanto sería de gran interés fisiológico estudiar la importancia de este sistema en procesos de desuso en los cuales se presenta pérdidas de masa ósea y muscular como es el caso de la denervación o la suspensión de las extremidades posteriores, modelos en los cuales se reduce la carga mecánica en el sistema óseo en los cuales se podría valorar en el animal in-vivo la colocación de ATP intramuscular para determinar su efecto en la regulación de la masa ósea y muscular, al igual que podría de ser de gran interés fisiológico estudiar el efecto del ATP extracelular en las adaptaciones del músculo y el hueso con el entrenamiento deportivo, para lo cual una metodología posible es analizar los cambios producidos

con el ejercicio en presencia de un inhibidor de ecto-ATPasa como (ARL 67156) y con apirasa (ectonucleotidasa), lo que permitirá evaluar el efecto de disminuir y de incrementar la señal de ATP extracelular determinando su importancia en mecanismos de regulación de la masa muscular y ósea post ejercicio.

Los hallazgos del presente trabajo se resumen en el modelo de la figura 28. Será relevante estudiar los alcances de esta vía de comunicación hueso-músculo en modelos animales fisiológicos o asociados a patologías, entrenamiento o envejecimiento.

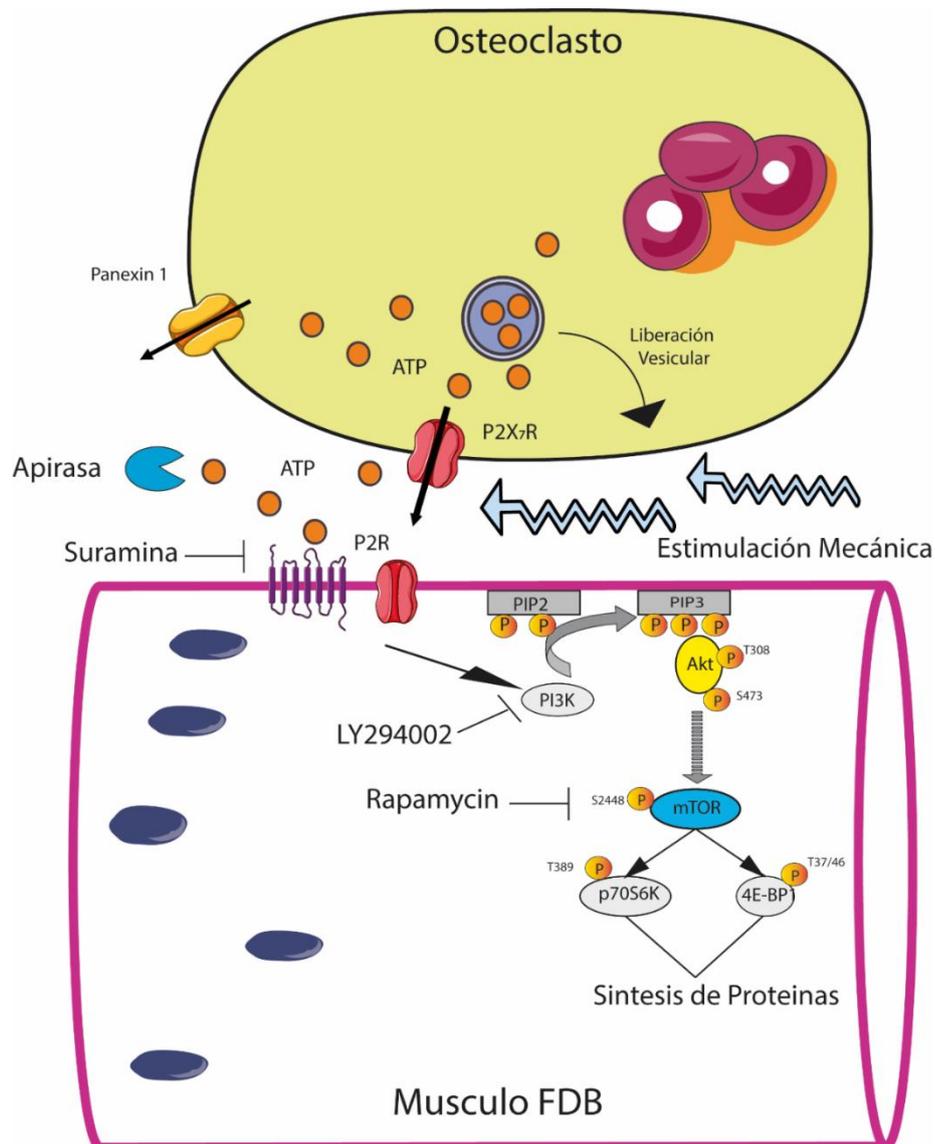


Figura 28. Modelo de comunicación paracrina entre osteoclastos purificados y músculo FDB a través de ATP extracelular. Los osteoclastos presentan liberaciones de ATP basal a través de la vía vesicular y la vía conductiva a través de panexina 1. Post estímulo mecánico, los receptores P2X₇ incrementan la liberación de ATP que difundirá a través del periostio y podrá activar al músculo esquelético a través de los receptores P2. Esta activación aumentará finalmente la síntesis de proteínas en las fibras musculares a través de activación de la vía PI3K Akt/mTOR/ p70S6K/4E-BP1.

6. CONCLUSIONES

1. Osteoclastos derivados de la línea celular RAW264,7 son sensibles a estímulos mecánicos de movimiento de medio (flujo turbulento).
2. Los osteoclastos liberan ATP al medio extracelular tanto en condiciones basales como por estimulación mecánica, a través de vías reguladas que involucran diferencialmente la secreción vesicular tipo exocitosis o conductiva a través de hemicanales de Pnx1 o receptores P2X₇.
3. ATP exógeno induce la síntesis proteica en músculo FDB de ratón, por activación de la vía P2-PI3K-Akt-mTOR.
4. La estimulación mecánica de osteoclastos promueve una señalización paracrina a través de ATP extracelular, que induce la síntesis proteica en músculo FDB de ratón a través de la vía P2-PI3K-Akt-mTOR.

7. PROYECCIONES

El ATP liberado por los osteoclastos podría activar directamente las células musculares, o promover la liberación desde los osteoclastos de otras moléculas (ostequinas), de mayor vida media o potencia, que tengan efecto inductor de la masa muscular.

La señalización de los osteoclastos hacia el músculo esquelético podría ser relevante, por ejemplo, en procesos de injuria musculoesquelética (lesiones, fracturas), en que aumenta la tasa de osteoclastos en el hueso para remover el tejido dañado para permitir su reparación por parte de los osteoblastos. En esta situación, el ATP liberado desde osteoclastos podría participar en la mantención o reparación del tejido muscular.

El ATP extracelular sería una molécula reguladora de la homeostasis musculoesquelética, secretada por múltiples tipos celulares del sistema tanto basalmente como en respuesta a patologías o daño.

Este trabajo abre una nueva área de interés clínico en patologías tales como distrofias musculares, en condiciones como la pérdida de masa muscular durante el envejecimiento (sarcopenia), o en procesos adaptativos relacionados con el uso/desuso muscular. Aparte de su relevancia clínica, conocer los procesos que controlan la masa muscular es un blanco atractivo en el área de fisiología del ejercicio y el entrenamiento de alto rendimiento.

8. REFERENCIAS

- Andersen, P., & Saltin, B. (1985). Maximal perfusion of skeletal muscle in man. *J Physiol*, 366, 233-249.
- Anderson, P. S., Renaud, S., & Rayfield, E. J. (2014). Adaptive plasticity in the mouse mandible. *BMC Evol Biol*, 14, 85. doi:10.1186/1471-2148-14-85
- Bagi, C. M., Berryman, E., & Moalli, M. R. (2011). Comparative bone anatomy of commonly used laboratory animals: implications for drug discovery. *Comp Med*, 61(1), 76-85.
- Bajaj, D., Allerton, B. M., Kirby, J. T., Miller, F., Rowe, D. A., Pohlig, R. T., & Modlesky, C. M. (2015). Muscle volume is related to trabecular and cortical bone architecture in typically developing children. *Bone*, 81, 217-227. doi:10.1016/j.bone.2015.07.014
- Bao, L., Locovei, S., & Dahl, G. (2004). Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS Lett*, 572(1-3), 65-68. doi:10.1016/j.febslet.2004.07.009
- Bilbao, P. S., Santillan, G., & Boland, R. (2010). ATP stimulates the proliferation of MCF-7 cells through the PI3K/Akt signaling pathway. *Arch Biochem Biophys*, 499(1-2), 40-48. doi:10.1016/j.abb.2010.05.001
- Bodine, S. C., Stitt, T. N., Gonzalez, M., Kline, W. O., Stover, G. L., Bauerlein, R., . . . Yancopoulos, G. D. (2001). Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol*, 3(11), 1014-1019. doi:10.1038/ncb1101-1014
- Bolon, B., Morony, S., Cheng, Y., Hu, Y. L., & Feige, U. (2004). Osteoclast numbers in Lewis rats with adjuvant-induced arthritis: identification of preferred sites and parameters for rapid quantitative analysis. *Vet Pathol*, 41(1), 30-36. doi:10.1354/vp.41-1-30
- Bonewald, L. F. (2011). The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res*, 26(2), 229-238. doi:10.1002/jbmr.320
- Bouleftour, W., Juignet, L., Bouet, G., Granito, R. N., Vanden-Bossche, A., Laroche, N., . . . Malaval, L. (2016). The role of the SIBLING, Bone Sialoprotein in skeletal biology - Contribution of mouse experimental genetics. *Matrix Biol*, 52-54, 60-77. doi:10.1016/j.matbio.2015.12.011
- Boyle, W. J., Simonet, W. S., & Lacey, D. L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423(6937), 337-342. doi:10.1038/nature01658
- Brandao-Burch, A., Key, M. L., Patel, J. J., Arnett, T. R., & Orriss, I. R. (2012). The P2X7 Receptor is an Important Regulator of Extracellular ATP Levels. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 3, 41. doi:10.3389/fendo.2012.00041
- Brotto, M., & Bonewald, L. (2015). Bone and muscle: Interactions beyond mechanical. *Bone*, 80, 109-114. doi:10.1016/j.bone.2015.02.010
- Buckingham, M., Bajard, L., Chang, T., Daubas, P., Hadchouel, J., Meilhac, S., . . . Relaix, F. (2003). The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J Anat*, 202(1), 59-68.
- Buckley, K. A., Hipkind, R. A., Gartland, A., Bowler, W. B., & Gallagher, J. A. (2002). Adenosine triphosphate stimulates human osteoclast activity via upregulation of osteoblast-expressed receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand. *Bone*, 31(5), 582-590.
- Buenzli, P. R., & Sims, N. A. (2015). Quantifying the osteocyte network in the human skeleton. *Bone*, 75, 144-150. doi:10.1016/j.bone.2015.02.016
- Burnstock, G. (2014). Purinergic signalling: from discovery to current developments. *Exp Physiol*, 99(1), 16-34. doi:10.1113/expphysiol.2013.071951
- Burnstock, G., Arnett, T. R., & Orriss, I. R. (2013). Purinergic signalling in the musculoskeletal system. *Purinergic Signal*, 9(4), 541-572. doi:10.1007/s11302-013-9381-4
- Burr, D. B. (1997). Muscle strength, bone mass, and age-related bone loss. *J Bone Miner Res*, 12(10), 1547-1551. doi:10.1359/jbmr.1997.12.10.1547

- Bustamante, M., Fernandez-Verdejo, R., Jaimovich, E., & Buvinic, S. (2014). Electrical stimulation induces IL-6 in skeletal muscle through extracellular ATP by activating Ca(2+) signals and an IL-6 autocrine loop. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 306(8), E869-882. doi:10.1152/ajpendo.00450.2013
- Buvinic, S., Almarza, G., Bustamante, M., Casas, M., Lopez, J., Riquelme, M., . . . Jaimovich, E. (2009). ATP released by electrical stimuli elicits calcium transients and gene expression in skeletal muscle. *J Biol Chem*, 284(50), 34490-34505. doi:10.1074/jbc.M109.057315
- Cappariello, A., Maurizi, A., Veeriah, V., & Teti, A. (2014). The Great Beauty of the osteoclast. *Arch Biochem Biophys*, 558, 70-78. doi:10.1016/j.abb.2014.06.017
- Carrasco, M. A., Riveros, N., Rios, J., Muller, M., Torres, F., Pineda, J., . . . Jaimovich, E. (2003). Depolarization-induced slow calcium transients activate early genes in skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 284(6), C1438-1447. doi:10.1152/ajpcell.00117.2002
- Casas, M., Buvinic, S., & Jaimovich, E. (2014). ATP signaling in skeletal muscle: from fiber plasticity to regulation of metabolism. *Exerc Sport Sci Rev*, 42(3), 110-116. doi:10.1249/JES.0000000000000017
- Cavalier, E., Bergmann, P., Bruyere, O., Delanaye, P., Durnez, A., Devogelaer, J. P., . . . Body, J. J. (2016). The role of biochemical of bone turnover markers in osteoporosis and metabolic bone disease: a consensus paper of the Belgian Bone Club. *Osteoporos Int*, 27(7), 2181-2195. doi:10.1007/s00198-016-3561-3
- Cianferotti, L., & Brandi, M. L. (2014). Muscle-bone interactions: basic and clinical aspects. *Endocrine*, 45(2), 165-177. doi:10.1007/s12020-013-0026-8
- Collin-Osdoby, P., & Osdoby, P. (2012). RANKL-mediated osteoclast formation from murine RAW 264.7 cells. *Methods Mol Biol*, 816, 187-202. doi:10.1007/978-1-61779-415-5_13
- Corriden, R., & Insel, P. A. (2010). Basal release of ATP: an autocrine-paracrine mechanism for cell regulation. *Sci Signal*, 3(104), re1. doi:10.1126/scisignal.3104re1
- Costessi, A., Pines, A., D'Andrea, P., Romanello, M., Damante, G., Cesaratto, L., . . . Tell, G. (2005). Extracellular nucleotides activate Runx2 in the osteoblast-like HOBIT cell line: a possible molecular link between mechanical stress and osteoblasts' response. *Bone*, 36(3), 418-432. doi:10.1016/j.bone.2004.10.016
- Chekeni, F. B., Elliott, M. R., Sandilos, J. K., Walk, S. F., Kinchen, J. M., Lazarowski, E. R., . . . Ravichandran, K. S. (2010). Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature*, 467(7317), 863-867. doi:10.1038/nature09413
- Chubb, S. A. (2012). Measurement of C-terminal telopeptide of type I collagen (CTX) in serum. *Clin Biochem*, 45(12), 928-935. doi:10.1016/j.clinbiochem.2012.03.035
- Deal, C. (2009). Potential new drug targets for osteoporosis. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 5(1), 20-27. doi:10.1038/ncprheum0977
- Diaz-Vegas, A., Campos, C. A., Contreras-Ferrat, A., Casas, M., Buvinic, S., Jaimovich, E., & Espinosa, A. (2015). ROS Production via P2Y1-PKC-NOX2 Is Triggered by Extracellular ATP after Electrical Stimulation of Skeletal Muscle Cells. *PLoS One*, 10(6), e0129882. doi:10.1371/journal.pone.0129882
- Dupont, E., Cieniewski-Bernard, C., Bastide, B., & Stevens, L. (2011). Electrostimulation during hindlimb unloading modulates PI3K-AKT downstream targets without preventing soleus atrophy and restores slow phenotype through ERK. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 300(2), R408-417. doi:10.1152/ajpregu.00793.2009
- Ebashi, S., Nonomura, Y., Kohama, K., Kitazawa, T., & Mikawa, T. (1980). Regulation of muscle contraction by Ca ion. *Mol Biol Biochem Biophys*, 32, 183-194.
- Ek-Rylander, B., & Andersson, G. (2010). Osteoclast migration on phosphorylated osteopontin is regulated by endogenous tartrate-resistant acid phosphatase. *Exp Cell Res*, 316(3), 443-451. doi:10.1016/j.yexcr.2009.10.019
- Evans, S. F., Parent, J. B., Lasko, C. E., Zhen, X., Knothe, U. R., Lemaire, T., & Knothe Tate, M. L. (2013). Periosteum, bone's "smart" bounding membrane, exhibits

- direction-dependent permeability. *J Bone Miner Res*, 28(3), 608-617. doi:10.1002/jbmr.1777
- Fernandez-Verdejo, R., Casas, M., Galgani, J. E., Jaimovich, E., & Buvinic, S. (2014). Exercise sensitizes skeletal muscle to extracellular ATP for IL-6 expression in mice. *Int J Sports Med*, 35(4), 273-279. doi:10.1055/s-0033-1353147
- Fritton, S. P., & Weinbaum, S. (2009). Fluid and Solute Transport in Bone: Flow-Induced Mechanotransduction. *Annu Rev Fluid Mech*, 41, 347-374. doi:10.1146/annurev.fluid.010908.165136
- Gao, C., Peng, S., Feng, P., & Shuai, C. (2017). Bone biomaterials and interactions with stem cells. *Bone Res*, 5, 17059. doi:10.1038/boneres.2017.59
- Garnero, P. (2015). The Role of Collagen Organization on the Properties of Bone. *Calcif Tissue Int*, 97(3), 229-240. doi:10.1007/s00223-015-9996-2
- Genetos, D. C., Geist, D. J., Liu, D., Donahue, H. J., & Duncan, R. L. (2005). Fluid shear-induced ATP secretion mediates prostaglandin release in MC3T3-E1 osteoblasts. *J Bone Miner Res*, 20(1), 41-49. doi:10.1359/JBMR.041009
- Genetos, D. C., Kephart, C. J., Zhang, Y., Yellowley, C. E., & Donahue, H. J. (2007). Oscillating fluid flow activation of gap junction hemichannels induces ATP release from MLO-Y4 osteocytes. *J Cell Physiol*, 212(1), 207-214. doi:10.1002/jcp.21021
- Gerasimovskaya, E. V., Tucker, D. A., Weiser-Evans, M., Wenzlau, J. M., Klemm, D. J., Banks, M., & Stenmark, K. R. (2005). Extracellular ATP-induced proliferation of adventitial fibroblasts requires phosphoinositide 3-kinase, Akt, mammalian target of rapamycin, and p70 S6 kinase signaling pathways. *J Biol Chem*, 280(3), 1838-1848. doi:10.1074/jbc.M409466200
- Gingras, A. C., Gygi, S. P., Raught, B., Polakiewicz, R. D., Abraham, R. T., Hoekstra, M. F., . . . Sonenberg, N. (1999). Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev*, 13(11), 1422-1437.
- Goodman, C. A., & Hornberger, T. A. (2013). Measuring protein synthesis with SUnSET: a valid alternative to traditional techniques? *Exerc Sport Sci Rev*, 41(2), 107-115. doi:10.1097/JES.0b013e3182798a95
- Grishin, S. N., Teplov, A. Y., Galkin, A. V., Devyataev, A. M., Zefirov, A. L., Mukhamedyarov, M. A., . . . Palotas, A. (2006). Different effects of ATP on the contractile activity of mice diaphragmatic and skeletal muscles. *Neurochem Int*, 49(8), 756-763. doi:10.1016/j.neuint.2006.06.007
- Hoebertz, A., Arnett, T. R., & Burnstock, G. (2003). Regulation of bone resorption and formation by purines and pyrimidines. *Trends Pharmacol Sci*, 24(6), 290-297. doi:10.1016/S0165-6147(03)00123-8
- Honma, M., Ikebuchi, Y., Kariya, Y., Hayashi, M., Hayashi, N., Aoki, S., & Suzuki, H. (2013). RANKL subcellular trafficking and regulatory mechanisms in osteocytes. *J Bone Miner Res*, 28(9), 1936-1949. doi:10.1002/jbmr.1941
- Hu, L. Y., Sun, Z. G., Wen, Y. M., Cheng, G. Z., Wang, S. L., Zhao, H. B., & Zhang, X. R. (2010). ATP-mediated protein kinase B Akt/mammalian target of rapamycin mTOR/p70 ribosomal S6 protein p70S6 kinase signaling pathway activation promotes improvement of locomotor function after spinal cord injury in rats. *Neuroscience*, 169(3), 1046-1062. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.05.046
- Humphrey, M. B., & Nakamura, M. C. (2016). A Comprehensive Review of Immunoreceptor Regulation of Osteoclasts. *Clin Rev Allergy Immunol*, 51(1), 48-58. doi:10.1007/s12016-015-8521-8
- Huwiler, A., Rolz, W., Dorsch, S., Ren, S., & Pfeilschifter, J. (2002). Extracellular ATP and UTP activate the protein kinase B/Akt cascade via the P2Y(2) purinoceptor in renal mesangial cells. *Br J Pharmacol*, 136(4), 520-529. doi:10.1038/sj.bjp.0704748
- Jilka, R. L., Hangoc, G., Girasole, G., Passeri, G., Williams, D. C., Abrams, J. S., . . . Manolagas, S. C. (1992). Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science*, 257(5066), 88-91.
- Jorquera, G., Altamirano, F., Contreras-Ferrat, A., Almarza, G., Buvinic, S., Jacquemond, V., . . . Casas, M. (2013). Cav1.1 controls frequency-dependent events regulating

- adult skeletal muscle plasticity. *J Cell Sci*, 126(Pt 5), 1189-1198. doi:10.1242/jcs.116855
- Juffer, P., Jaspers, R. T., Lips, P., Bakker, A. D., & Klein-Nulend, J. (2012). Expression of muscle anabolic and metabolic factors in mechanically loaded MLO-Y4 osteocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 302(4), E389-395. doi:10.1152/ajpendo.00320.2011
- Kaji, H. (2014). Interaction between Muscle and Bone. *J Bone Metab*, 21(1), 29-40. doi:10.11005/jbm.2014.21.1.29
- Katz, S., Ayala, V., Santillan, G., & Boland, R. (2011). Activation of the PI3K/Akt signaling pathway through P2Y(2) receptors by extracellular ATP is involved in osteoblastic cell proliferation. *Arch Biochem Biophys*, 513(2), 144-152. doi:10.1016/j.abb.2011.06.013
- Kaufman, H., Reznick, A., Stein, H., Barak, M., & Maor, G. (2008). The biological basis of the bone-muscle inter-relationship in the algorithm of fracture healing. *Orthopedics*, 31(8), 751.
- Kim, J. H., & Kim, N. (2016). Signaling Pathways in Osteoclast Differentiation. *Chonnam Med J*, 52(1), 12-17. doi:10.4068/cmj.2016.52.1.12
- Knothe Tate, M. L., Yu, N. Y., Jalilian, I., Pereira, A. F., & Knothe, U. R. (2016). Periosteum mechanobiology and mechanistic insights for regenerative medicine. *Bonekey Rep*, 5, 857. doi:10.1038/bonekey.2016.70
- Korcok, J., Raimundo, L. N., Du, X., Sims, S. M., & Dixon, S. J. (2005). P2Y6 nucleotide receptors activate NF-kappaB and increase survival of osteoclasts. *J Biol Chem*, 280(17), 16909-16915. doi:10.1074/jbc.M410764200
- Kringelbach, T. M., Aslan, D., Novak, I., Ellegaard, M., Syberg, S., Andersen, C. K., . . . Jorgensen, N. R. (2015). Fine-tuned ATP signals are acute mediators in osteocyte mechanotransduction. *Cell Signal*, 27(12), 2401-2409. doi:10.1016/j.cellsig.2015.08.016
- Kwan, P. (2015). Osteoporosis: from osteoscience to neuroscience and beyond. *Mech Ageing Dev*, 145, 26-38. doi:10.1016/j.mad.2015.02.001
- Lai, X., Price, C., Lu, X. L., & Wang, L. (2014). Imaging and quantifying solute transport across periosteum: implications for muscle-bone crosstalk. *Bone*, 66, 82-89. doi:10.1016/j.bone.2014.06.002
- Laurent, M. R., Dubois, V., Claessens, F., Verschuere, S. M., Vanderschuere, D., Gielen, E., & Jardi, F. (2016). Muscle-bone interactions: From experimental models to the clinic? A critical update. *Mol Cell Endocrinol*, 432, 14-36. doi:10.1016/j.mce.2015.10.017
- Lazarowski, E. R. (2012). Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release. *Purinergic Signal*, 8(3), 359-373. doi:10.1007/s11302-012-9304-9
- Leger, B., Cartoni, R., Praz, M., Lamon, S., Deriaz, O., Crettenand, A., . . . Russell, A. P. (2006). Akt signalling through GSK-3beta, mTOR and Foxo1 is involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *J Physiol*, 576(Pt 3), 923-933. doi:10.1113/jphysiol.2006.116715
- Li, P., Bian, X., Liu, C., Wang, S., Guo, M., Tao, Y., & Huo, B. (2018). STIM1 and TRPV4 regulate fluid flow-induced calcium oscillation at early and late stages of osteoclast differentiation. *Cell Calcium*, 71, 45-52. doi:10.1016/j.ceca.2017.12.001
- Liu, J., Liu, W., & Yang, J. (2016). ATP-containing vesicles in stria vascular marginal cell cytoplasm in neonatal rat cochlea are lysosomes. *Sci Rep*, 6, 20903. doi:10.1038/srep20903
- Locovei, S., Wang, J., & Dahl, G. (2006). Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. *FEBS Lett*, 580(1), 239-244. doi:10.1016/j.febslet.2005.12.004
- Long, F. (2011). Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(1), 27-38. doi:10.1038/nrm3254
- Lv, Y., Wang, G., Xu, W., Tao, P., Lv, X., & Wang, Y. (2015). Tartrate-resistant acid phosphatase 5b is a marker of osteoclast number and volume in RAW 264.7 cells

- treated with receptor-activated nuclear kappaB ligand. *Exp Ther Med*, 9(1), 143-146. doi:10.3892/etm.2014.2071
- Malaval, L., Wade-Gueye, N. M., Boudiffa, M., Fei, J., Zirngibl, R., Chen, F., . . . Aubin, J. E. (2008). Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis. *J Exp Med*, 205(5), 1145-1153. doi:10.1084/jem.20071294
- Matthews, G. G. (2003). *Cellular physiology of nerve and muscle* (4. ed.). Malden, Mass.: Blackwell Publ.
- Maurel, D. B., Jahn, K., & Lara-Castillo, N. (2017). Muscle-Bone Crosstalk: Emerging Opportunities for Novel Therapeutic Approaches to Treat Musculoskeletal Pathologies. *Biomedicines*, 5(4). doi:10.3390/biomedicines5040062
- Mera, P., Laue, K., Ferron, M., Confavreux, C., Wei, J., Galan-Diez, M., . . . Karsenty, G. (2016). Osteocalcin Signaling in Myofibers Is Necessary and Sufficient for Optimum Adaptation to Exercise. *Cell Metab*, 23(6), 1078-1092. doi:10.1016/j.cmet.2016.05.004
- Mera, P., Laue, K., Wei, J., Berger, J. M., & Karsenty, G. (2016). Osteocalcin is necessary and sufficient to maintain muscle mass in older mice. *Mol Metab*, 5(10), 1042-1047. doi:10.1016/j.molmet.2016.07.002
- Morrison, S. J., & Scadden, D. T. (2014). The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*, 505(7483), 327-334. doi:10.1038/nature12984
- Nakano, Y., Addison, W. N., & Kaartinen, M. T. (2007). ATP-mediated mineralization of MC3T3-E1 osteoblast cultures. *Bone*, 41(4), 549-561. doi:10.1016/j.bone.2007.06.011
- Naylor, K., & Eastell, R. (2012). Bone turnover markers: use in osteoporosis. *Nat Rev Rheumatol*, 8(7), 379-389. doi:10.1038/nrrheum.2012.86
- Novinec, M., & Lenarcic, B. (2013). Cathepsin K: a unique collagenolytic cysteine peptidase. *Biol Chem*, 394(9), 1163-1179. doi:10.1515/hsz-2013-0134
- Novotny, S. A., Warren, G. L., & Hamrick, M. W. (2015). Aging and the muscle-bone relationship. *Physiology (Bethesda)*, 30(1), 8-16. doi:10.1152/physiol.00033.2014
- Oftadeh, R., Entezari, V., Sporri, G., Villa-Camacho, J. C., Krigbaum, H., Strawich, E., . . . Nazarian, A. (2015). Hierarchical analysis and multi-scale modelling of rat cortical and trabecular bone. *J R Soc Interface*, 12(106). doi:10.1098/rsif.2015.0070
- Orriss, I. R. (2015). The role of purinergic signalling in the musculoskeletal system. *Auton Neurosci*, 191, 124-134. doi:10.1016/j.autneu.2015.04.013
- Orriss, I. R., Burnstock, G., & Arnett, T. R. (2010). Purinergic signalling and bone remodelling. *Curr Opin Pharmacol*, 10(3), 322-330. doi:10.1016/j.coph.2010.01.003
- Orriss, I. R., Wang, N., Burnstock, G., Arnett, T. R., Gartland, A., Robaye, B., & Boeynaems, J. M. (2011). The P2Y(6) receptor stimulates bone resorption by osteoclasts. *Endocrinology*, 152(10), 3706-3716. doi:10.1210/en.2011-1073
- Osorio-Fuentealba, C., Contreras-Ferrat, A. E., Altamirano, F., Espinosa, A., Li, Q., Niu, W., . . . Jaimovich, E. (2013). Electrical stimuli release ATP to increase GLUT4 translocation and glucose uptake via PI3Kgamma-Akt-AS160 in skeletal muscle cells. *Diabetes*, 62(5), 1519-1526. doi:10.2337/db12-1066
- Penuela, S., Gehi, R., & Laird, D. W. (2013). The biochemistry and function of pannexin channels. *Biochim Biophys Acta*, 1828(1), 15-22. doi:10.1016/j.bbamem.2012.01.017
- Perrini, S., Laviola, L., Carreira, M. C., Cignarelli, A., Natalicchio, A., & Giorgino, F. (2010). The GH/IGF1 axis and signaling pathways in the muscle and bone: mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and osteoporosis. *J Endocrinol*, 205(3), 201-210. doi:10.1677/JOE-09-0431
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29(9), e45.
- Plotkin, L. I., & Bellido, T. (2016). Osteocytic signalling pathways as therapeutic targets for bone fragility. *Nat Rev Endocrinol*, 12(10), 593-605. doi:10.1038/nrendo.2016.71

- Price, C., Zhou, X., Li, W., & Wang, L. (2011). Real-time measurement of solute transport within the lacunar-canalicular system of mechanically loaded bone: direct evidence for load-induced fluid flow. *J Bone Miner Res*, *26*(2), 277-285. doi:10.1002/jbmr.211
- Raggatt, L. J., & Partridge, N. C. (2010). Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem*, *285*(33), 25103-25108. doi:10.1074/jbc.R109.041087
- Romanello, M., Codognotto, A., Bicego, M., Pines, A., Tell, G., & D'Andrea, P. (2005). Autocrine/paracrine stimulation of purinergic receptors in osteoblasts: contribution of vesicular ATP release. *Biochem Biophys Res Commun*, *331*(4), 1429-1438. doi:10.1016/j.bbrc.2005.03.246
- Rubin, C. T., McLeod, K. J., & Bain, S. D. (1990). Functional strains and cortical bone adaptation: epigenetic assurance of skeletal integrity. *J Biomech*, *23 Suppl 1*, 43-54.
- Rumney, R. M., Wang, N., Agrawal, A., & Gartland, A. (2012). Purinergic signalling in bone. *Front Endocrinol (Lausanne)*, *3*, 116. doi:10.3389/fendo.2012.00116
- Schiaffino, S., Dyar, K. A., Ciciliot, S., Blaauw, B., & Sandri, M. (2013). Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J*, *280*(17), 4294-4314. doi:10.1111/febs.12253
- Schiaffino, S., & Mammucari, C. (2011). Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skelet Muscle*, *1*(1), 4. doi:10.1186/2044-5040-1-4
- Schmidt, E. K., Clavarino, G., Ceppi, M., & Pierre, P. (2009). SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. *Nat Methods*, *6*(4), 275-277. doi:10.1038/nmeth.1314
- Seminario-Vidal, L., Okada, S. F., Sesma, J. I., Kreda, S. M., van Heusden, C. A., Zhu, Y., . . . Lazarowski, E. R. (2011). Rho signaling regulates pannexin 1-mediated ATP release from airway epithelia. *J Biol Chem*, *286*(30), 26277-26286. doi:10.1074/jbc.M111.260562
- Silinsky, E. M., & Redman, R. S. (1996). Synchronous release of ATP and neurotransmitter within milliseconds of a motor nerve impulse in the frog. *J Physiol*, *492 (Pt 3)*, 815-822.
- Sims, N. A., & Martin, T. J. (2014). Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *Bonekey Rep*, *3*, 481. doi:10.1038/bonekey.2013.215
- Sun, L. W., Blottner, D., Luan, H. Q., Salanova, M., Wang, C., Niu, H. J., . . . Fan, Y. B. (2013). Bone and muscle structure and quality preserved by active versus passive muscle exercise on a new stepper device in 21 days tail-suspended rats. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, *13*(2), 166-177.
- Tagliaferri, C., Wittrant, Y., Davicco, M. J., Walrand, S., & Coxam, V. (2015). Muscle and bone, two interconnected tissues. *Ageing Res Rev*, *21*, 55-70. doi:10.1016/j.arr.2015.03.002
- Takahashi, N., Udagawa, N., & Suda, T. (1999). A new member of tumor necrosis factor ligand family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function. *Biochem Biophys Res Commun*, *256*(3), 449-455. doi:10.1006/bbrc.1999.0252
- Takayanagi, H. (2009). Osteoimmunology and the effects of the immune system on bone. *Nat Rev Rheumatol*, *5*(12), 667-676. doi:10.1038/nrrheum.2009.217
- Tee, A. R., Fingar, D. C., Manning, B. D., Kwiatkowski, D. J., Cantley, L. C., & Blenis, J. (2002). Tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products function together to inhibit mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated downstream signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(21), 13571-13576. doi:10.1073/pnas.202476899
- Thi, M. M., Islam, S., Suadicani, S. O., & Spray, D. C. (2012). Connexin43 and pannexin1 channels in osteoblasts: who is the "hemichannel"? *J Membr Biol*, *245*(7), 401-409. doi:10.1007/s00232-012-9462-2
- Thi, M. M., Suadicani, S. O., Schaffler, M. B., Weinbaum, S., & Spray, D. C. (2013). Mechanosensory responses of osteocytes to physiological forces occur along

- processes and not cell body and require alphaVbeta3 integrin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(52), 21012-21017. doi:10.1073/pnas.1321210110
- Thompson, W. R., Majid, A. S., Czymmek, K. J., Ruff, A. L., Garcia, J., Duncan, R. L., & Farach-Carson, M. C. (2011). Association of the alpha(2)delta(1) subunit with Ca(v)3.2 enhances membrane expression and regulates mechanically induced ATP release in MLO-Y4 osteocytes. *J Bone Miner Res*, 26(9), 2125-2139. doi:10.1002/jbmr.437
- Thompson, W. R., Rubin, C. T., & Rubin, J. (2012). Mechanical regulation of signaling pathways in bone. *Gene*, 503(2), 179-193. doi:10.1016/j.gene.2012.04.076
- Valladares, D., Almarza, G., Contreras, A., Pavez, M., Buvinic, S., Jaimovich, E., & Casas, M. (2013). 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*, 8(11), e75340. doi:10.1371/journal.pone.0075340
- Viguet-Carrin, S., Garnero, P., & Delmas, P. D. (2006). The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int*, 17(3), 319-336. doi:10.1007/s00198-005-2035-9
- Walsh, M. C., & Choi, Y. (2014). Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond. *Front Immunol*, 5, 511. doi:10.3389/fimmu.2014.00511
- Wang, L., Wang, Y., Han, Y., Henderson, S. C., Majeska, R. J., Weinbaum, S., & Schaffler, M. B. (2005). In situ measurement of solute transport in the bone lacunar-canalicular system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(33), 11911-11916. doi:10.1073/pnas.0505193102
- Wang, N., Robaye, B., Agrawal, A., Skerry, T. M., Boeynaems, J. M., & Gartland, A. (2012). Reduced bone turnover in mice lacking the P2Y13 receptor of ADP. *Mol Endocrinol*, 26(1), 142-152. doi:10.1210/me.2011-1083
- Wen, X., Yi, L. Z., Liu, F., Wei, J. H., & Xue, Y. (2016). The role of cathepsin K in oral and maxillofacial disorders. *Oral Dis*, 22(2), 109-115. doi:10.1111/odi.12378
- Willey, J. S., Lloyd, S. A., Robbins, M. E., Bourland, J. D., Smith-Sielicki, H., Bowman, L. C., . . . Bateman, T. A. (2008). Early increase in osteoclast number in mice after whole-body irradiation with 2 Gy X rays. *Radiat Res*, 170(3), 388-392. doi:10.1667/RR1388.1
- Xiao, W., Wang, Y., Pacios, S., Li, S., & Graves, D. T. (2016). Cellular and Molecular Aspects of Bone Remodeling. *Front Oral Biol*, 18, 9-16. doi:10.1159/000351895
- Xiong, J., Piemontese, M., Onal, M., Campbell, J., Goellner, J. J., Dusevich, V., . . . O'Brien, C. A. (2015). Osteocytes, not Osteoblasts or Lining Cells, are the Main Source of the RANKL Required for Osteoclast Formation in Remodeling Bone. *PLoS One*, 10(9), e0138189. doi:10.1371/journal.pone.0138189
- Yu, H., & Ferrier, J. (1993). ATP induces an intracellular calcium pulse in osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 191(2), 357-363.
- Zimmermann, H., Zebisch, M., & Strater, N. (2012). Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal*, 8(3), 437-502. doi:10.1007/s11302-012-9309-4
- Zoch, M. L., Clemens, T. L., & Riddle, R. C. (2016). New insights into the biology of osteocalcin. *Bone*, 82, 42-49. doi:10.1016/j.bone.2015.05.046

ANEXO 1.



COMITÉ DE BIOÉTICA EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN (CBAE)

CERTIFICADO N° 061501

Se certifica que, en calidad de Investigador Responsable, la Dra. Sonja Buvinic solicitó la evaluación del Proyecto titulado **“UNVEILING MOLECULAR BASIS FOR MUSCLE REMODELING AND MUSCLE-BONE CROSSTALK AT THE MASTICATORY APPARATUS: EXTRACELULAR ATP AS A SIGNALING MOLECULE”**. En base a lo evaluado, este comité certifica que en el protocolo de procedimiento presentado (N° FOUCH061501) no se plantean acciones que contravengan las normas bioéticas básicas de manejo y cuidado de los animales a utilizar en los procedimientos experimentales planificados.

Además, la Dra. Sonja Buvinic se ha comprometido a mantener los procedimientos experimentales planteados en el protocolo de trabajo y a no realizar ninguna modificación sin previa información y posterior aprobación por parte de este comité.

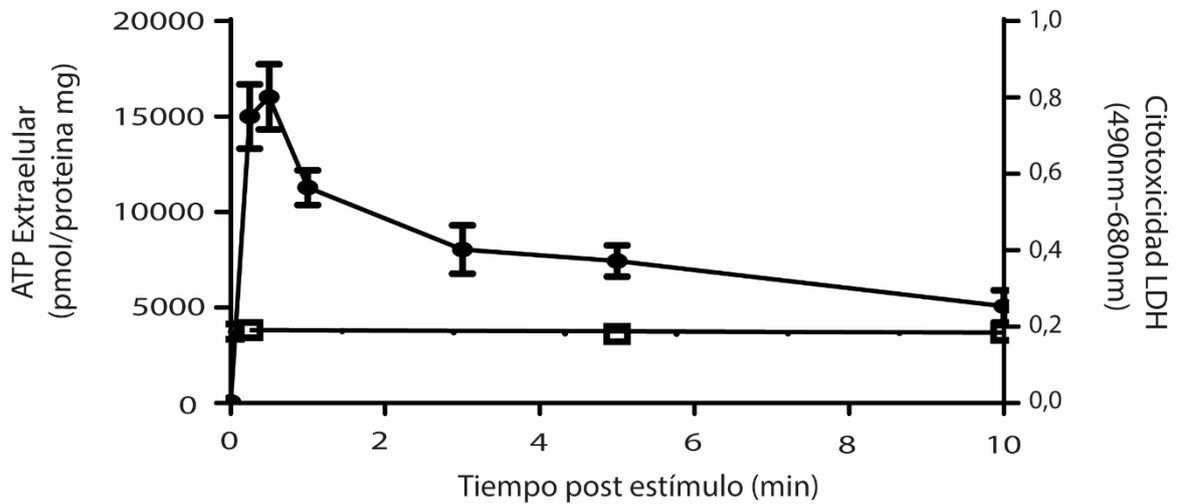
Se otorga la presente certificación por el tiempo que dure la realización de este proyecto FONDECYT Regular N° 1151353.

Sin otro particular, saluda a Ud. muy cordialmente.

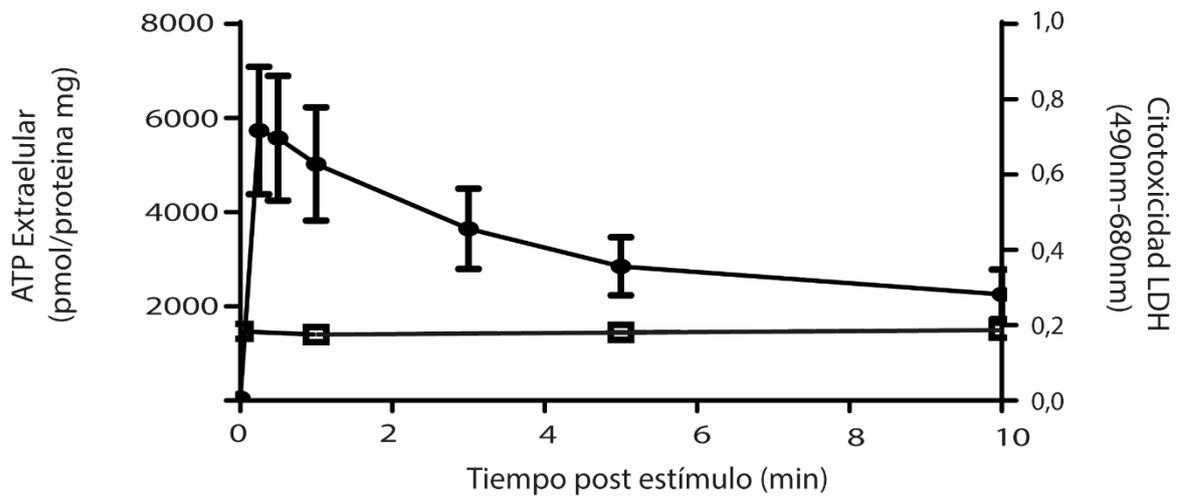

Mauricio Fernando Budini (PhD)
residente
Comité de Bioética en
Animales de Experimentación

COMITÉ DE BIOÉTICA EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN (CBAE)
cbae@odontologia.uchile.cl

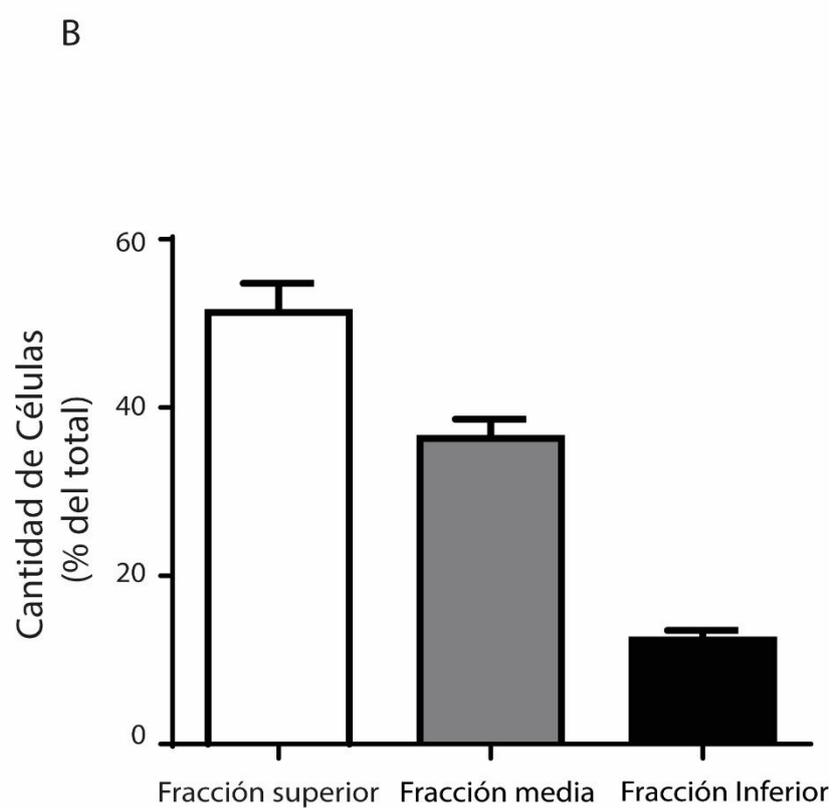
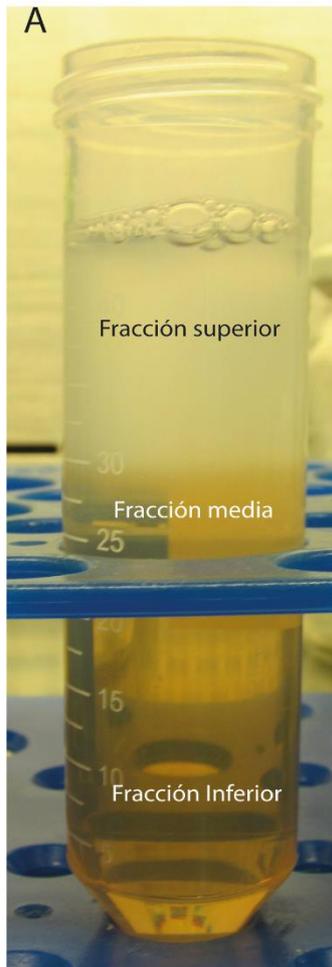
A. Raw Monocitos



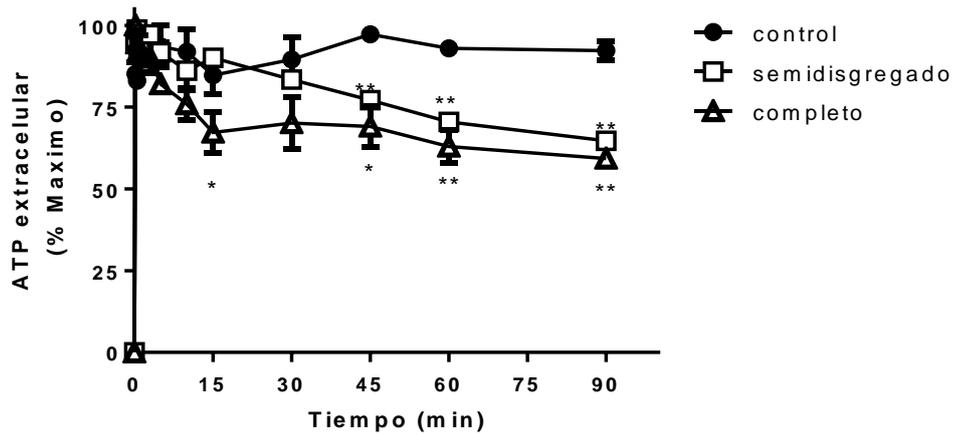
B. Raw 5d RANKL



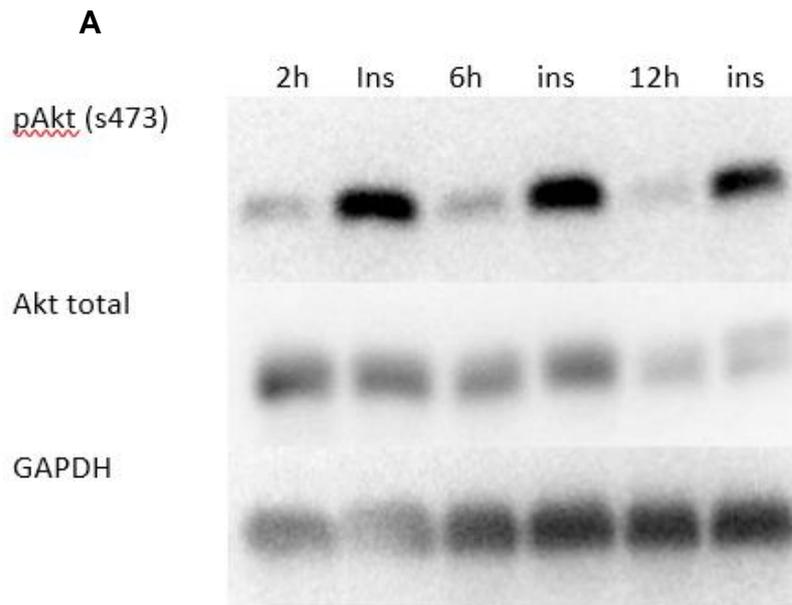
Anexo 2. Efecto de la estimulación mecánica en de la liberación de ATP (círculos negros) y los niveles de lactato deshidrogenasa extracelular (cuadrados blancos) en células RAW Monocito y RAW 5d RANK-L. n=6. Todos los datos fueron representados como promedio±SEM.



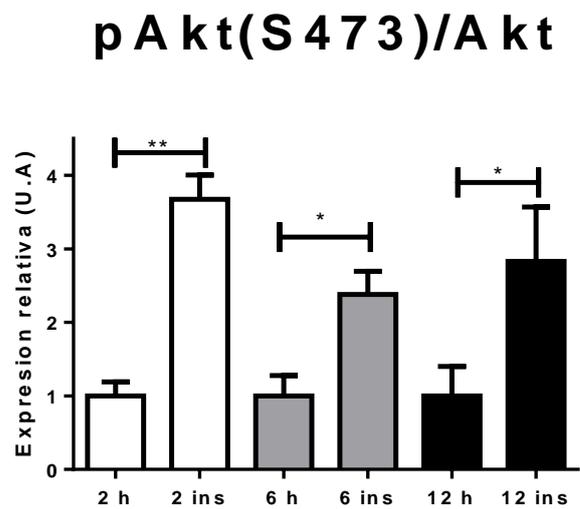
Anexo 3. Purificación de osteoclastos por gradiente de suero. Células RAW incubadas por 5d con RANKL 35 ng/mL fueron purificadas en una gradiente de suero. **A.** Imagen representativa de la gradiente de suero, en que se evidencian las tres fases a recolectar: superior, media e inferior. **B.** Cantidad de células en cada fase del fraccionamiento.



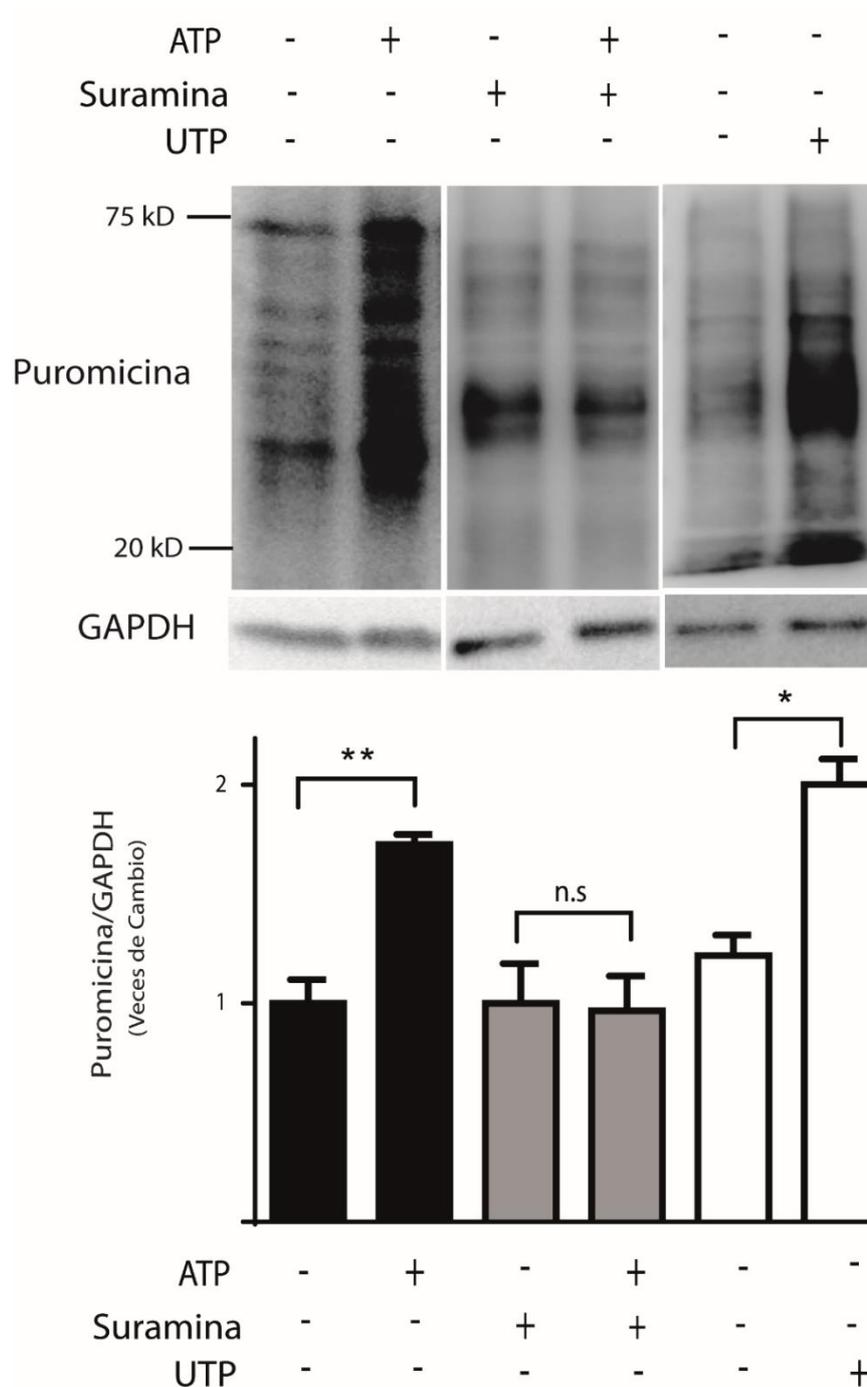
Anexo 4. Cinética de metabolización de ATP 100 μ M en contacto con músculo FDB aislado. El estímulo de 100 μ M de ATP se metaboliza lentamente en presencia de músculo FDB completo y semidisgregado. Se evaluó la disminución del ATP extracelular después de colocar una concentración de 100 μ M de ATP en placas de 35mm sin músculo (control), con músculo FDB (completo) y con músculo FDB pretratado con colagenasa IV durante 30 min (semidisgregado). n=3. Todos los datos fueron representados como promedio \pm SEM. *: p<0.05; **: p<0.01; test de Kruskal-Wallis post-hoc Dunn's.



B



Anexo 5. Efecto de la reducción de suero en la fosforilación de Akt inducida por insulina. Se evaluó el efecto de distintos tiempos de reducción de suero al 1% sobre la fosforilación de Akt en serina 473 inducida por insulina 100nM. **A.** Inmunoblot de homogenizado de músculo FDB completo con 2, 6 y 12 h de reducción con suero (20µg por carril) y su efecto en la fosforilación de Akt (S473). **B.** Análisis densitométrico de 5 experimentos. Todos los datos son presentados como promedio \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p > 0.01$, test de Mann-Whitney comparando cada grupo con su control.



Anexo 6. ATP y UTP promueven la síntesis de proteína en músculo FDB con potencia equivalente. Se evaluó el efecto de ATP 3 μ M (en ausencia o presencia de pre-incubación con suramina 100 μ M) o UTP 3 μ M sobre la incorporación de puromicina en músculo FDB aislado de. **Parte superior.** Inmunoblot de homogenizado de músculo FDB completo (20 μ g por carril) contra puromicina. **Parte inferior.** Análisis densitométrico de 3 experimentos. Todos los datos son presentados como promedio \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p > 0.01$, n.s. no significativo, test de Mann-Whitney comparando cada grupo con su control.