



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

**“CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES PURINÉRGICOS  
DE TIPO P2Y EN MÚSCULO MASETERO DE RATÓN”**

**Nathalie Alejandra Vicencio Cáceres.**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

**REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE**

**CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

Prof. Sonja Buvinic Radic, PhD.

**TUTOR ASOCIADO**

Prof. Paola Llanos Vidal, PhD.

**ASESOR**

Carolina Rojas Beato, MV, PhDc.

**Adscrito a Proyecto Fondecyt 1151353**  
**Santiago-Chile**  
**2018**





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

**“CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES PURINÉRGICOS  
DE TIPO P2Y EN MÚSCULO MASETERO DE RATÓN”.**

**Nathalie Vicencio Cáceres.**

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

**TUTOR PRINCIPAL**

Prof. Sonja Buvinic Radic, PhD.

**TUTOR ASOCIADO**

Prof. Paola Llanos Vidal, PhD.

**ASESOR**

Carolina Rojas Beato, MV, PhDc.

**Adscrito a Proyecto Fondecyt 1151353**  
**Santiago - Chile**  
**2018**

*Hay mujeres que luchan un día y son buenas.  
Hay otras que luchan un año y son mejores.  
Hay quienes luchan muchos años, y son muy buenas.  
Pero hay las que luchan toda la vida, esas son las imprescindibles*

## AGRADECIMIENTOS

*A mis padres, Cecilia y Osvaldo, por todo su amor y comprensión, por entregarme las herramientas y valores para ser quien soy y darme siempre la libertad para decidir en quien quiero convertirme. Por acompañarme siempre en cada una de mis locuras.*

*A Emilia y Álvaro por todos los abrazos, risas, buenos momentos y retos.*

*A mi familia, tanto materna como paterna, por estar pendiente en cada momento. En especial a Melanie, con quien hemos compartido toda una vida y a la Nena, por su huella imborrable en nuestros corazones.*

*A Braulio, por todos estos años de compañía y amor. Sin duda, la mejor de las casualidades que pude tener en estos años de carrera.*

*A los amigos de la vida, quienes están en cada minuto, sea de forma presencial o a kilómetros de distancia. También por aceptarme con errores y defectos.*

*A todo el Muscle-Bone Crosstalk Lab: Nadia, Manu, Walter, Julian, Papá Camilo y Francisco. Mención especial a Caro, la “Mother of Dragons” por los momentos de risa, frustración (que se convirtieron en risa), por su buena disposición en cada momento y cariño; y a Fernán, con quien compartimos y nos acompañamos en este proceso un poco desconocido para nosotros.*

*A la Prof. Dra. Sonja Buvinic R, por toda la preocupación constante a cada uno de nosotros, tanto académica como emocionalmente. Me llevo las mejores impresiones de Ud., tanto como docente y como persona. La universidad necesita más personas como Ud.*

*A la Prof. Dra. Paola Llanos., por su buena disposición a lo largo de este trabajo y contagiar con su buen humor.*

*A la Dra Daniela Salinas, por su sencillez y amor a esta carrera, quien me transmitió el ejemplo para ser una buena profesional el día de mañana.*

*A los funcionarios de la FOUCH, quienes más de alguna vez me dieron palabras de aliento.*

*Soy una convencida que los logros jamás son personales. Gracias totales.*

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. LISTA DE ABREVIATURAS .....	9
2. RESUMEN .....	11
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
4. MARCO TEÓRICO .....	14
4.1 Generalidades del músculo esquelético.....	14
4.1.2. Aspectos estructurales y funcionales del músculo masetero.....	16
4.2. Señalización por nucleótidos extracelulares.....	18
4.2.1. Generalidades .....	18
4.2.2. Señalización por nucleótidos extracelulares en músculo esquelético. .....	19
5. PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	21
6. HIPÓTESIS.....	22
7. OBJETIVO GENERAL.....	22
8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
9. METODOLOGÍA.....	23
9.1. Estrategia experimental.....	23
9.2. Materiales y métodos .....	25
9.3 Presentación y análisis estadístico.....	31
10. RESULTADOS.....	32
11. DISCUSIÓN .....	41
12. CONCLUSIONES .....	46
13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
14. ANEXOS .....	55
Anexo 1. Certificado de Bioética .....	55

Anexo 2. Certificado de Bioseguridad .....	56
--	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Función del músculo masetero. ....	17
Figura 2. Modelo de Acoplamiento Excitación-Transcripción en músculo esquelético de tronco y extremidades. ....	20
Figura 3. Curvas de disociación para la amplificación de distintos subtipos de receptores P2Y. ....	33
Figura 4. Expresión relativa de ARNm de distintos subtipos de receptores P2Y en músculo masetero de ratón. ....	34
Figura 5. Dot Blot para los distintos subtipos de receptores P2Y en músculo masetero de ratón.....	36
Figura 6. Inmunoblot de los distintos subtipos de receptores P2Y en músculo masetero de ratón.....	37
Figura 7. Inmunoblot con ausencia de anticuerpo primario y solo incubado anticuerpo secundario anti-cabra-HRP.....	37
Figura 8. Distribución celular de los receptores P2Y en músculo masetero de ratón. ....	40

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Partidores utilizados en la técnica de qPCR para amplificar ADNc derivados de ARNm para receptores purinérgicos de tipo P2Y.....	27
--	----

Tabla 2. Características de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados para las técnicas de dot blot, inmunoblot e inmunofluorescencia de los distintos subtipos de receptores P2Y en músculo masetero de ratón. ....	30
Tabla 3. Comparación de los niveles de ARNm de los distintos receptores P2Y en músculo masetero de ratón .....	34
Tabla 4. Resumen de la expresión de los distintos subtipos de receptores P2Y detectada en músculo masetero de ratón, según la técnica utilizada. ....	45

## 1. LISTA DE ABREVIATURAS

**ADN:** Ácido desoxiribonucleico

**ADNc:** Ácido Desoxiribonucleico complementario

**ADP:** Adenosina 5'-difosfato

**AET:** Acoplamiento Excitación-Transcripción

**AMP:** Adenosina 5'-monofosfato

**ARN:** Ácido Ribonucleico

**ARNm:** Ácido Ribonucleico mensajero

**ATP:** Adenosina 5'-trifosfato

**Ca<sup>2+</sup>:** Ion Calcio

**CREB:** “*cAMP response element-binding*”. Factor de transcripción de unión al elemento de respuesta a AMPc.

**DAG:** Diacilglicerol

**DHPR:** Receptor de dihidropiridinas (Cav 1.1)

**DNAasa:** Desoxiribonucleasa

**ERK:** Quinasa regulada por señales extracelulares

**FDB:** Músculo Flexor digitorum brevis

**GAPDH:** Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

**HRP:** Peroxidasa de rábano

**IL:** Interleuquina

**IP<sub>3</sub>:** Inositol 1,4,5- trifosfato

**IP<sub>3</sub>R:** Receptor de inositol 1,4,5- trifosfato

**MyHC:** Cadena pesada de la miosina

**NTC:** “*Non template control*”. Control blanco de la técnica de qPCR (sin ADNc).

**OPN:** Osteopontina

**P2Y:** Receptor purinérgico metabotrópico de tipo P2Y

**P2X:** Receptor purinérgico ionotrópico de tipo P2X

**Panx1:** Canal de panexina 1

**PBS:** Tampón fosfato salino

**PI3K:** Fosfatidil inositol 3-quinasa

**PIP<sub>2</sub>:** Fosfatidil inositol 4,5- difosfato

**PIP<sub>3</sub>:** Fosfatidil inositol 3,4,5- trifosfato

**PKC:** Proteína quinasa C

**PLC:** Fosfolipasa C

**PVDF:** Membrana de fluoruro de polivinilideno

**qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

**RANKL:** Ligando del receptor activador para el factor nuclear κB

**RT:** Transcripción reversa

**RyR:** Receptor de rianodina

**SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturante

**TBS:** Tampón salino tris-base

**UDP:** Uridina 5'-difosfato

**UTP:** Uridina 5'-trifosfato

## 2. RESUMEN

El sistema masticatorio es una estructura compleja, cuya actividad requiere la contracción de distintos músculos de cabeza y cuello para lograr un movimiento eficaz y preciso. Los músculos masticatorios juegan un rol fundamental en la mantención de la posición y coordinación del movimiento mandibular, y sus características anatómicas, histológicas y bioquímicas pueden variar frente a diferentes estímulos tanto fisiológicos, como patológicos.

Los cambios adaptativos y/o patológicos que experimenta el músculo esquelético conllevan a la liberación de diferentes mioquinas, que pueden tener efectos autocrinos, paracrinos o endocrinos. Las rutas de señalización asociadas a su producción han sido estudiadas en músculos de tronco y extremidades, y dentro de ellas se encuentra la señalización por ATP extracelular. En los últimos años se le ha asignado un nuevo rol a esta molécula, participando como un intermediario fundamental en los procesos de plasticidad muscular a través del “Acoplamiento Excitación-Transcripción”. Si bien, esta ruta ha sido muy estudiada en músculos de tronco y extremidades, se desconoce su relevancia en la fisiología de los músculos masticatorios, que son bioquímica y estructuralmente distintos al resto de los músculos del cuerpo.

Para estudiar esta ruta de señalización en los músculos masticatorios es fundamental conocer si sus componentes moleculares se encuentran presentes, razón por la que en el presente trabajo se utilizaron músculos maseteros de ratones BalbC machos de 6-8 semanas de edad, aislados y procesados inmediatamente para extracción de ARN total, extracción de proteínas o criocortes histológicos para caracterizar la expresión de los distintos subtipos de receptores de tipo P2Y. A través de qPCR, se logró demostrar que este músculo expresa ARNm de los receptores de tipo P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>12</sub> y P2Y<sub>14</sub> en razón P2Y<sub>1</sub>>P2Y<sub>12</sub>>P2Y<sub>2</sub>=P2Y<sub>6</sub>=P2Y<sub>14</sub>. Además, a través de inmunoblot se comprobó

la expresión proteica de dichos subtipos P2Y, además de P2Y<sub>4</sub>. Por medio de inmunofluorescencia en un corte transversal, se determinó que estos receptores se visualizan tanto en la superficie (sarcolema), como en el interior de la fibra, lo que podría corresponder a la vía exocítica, o a su presencia en túbulos T.

La presencia de estos receptores en músculo masetero de ratón sugiere que las vías de señalización mediadas por ATP extracelular podrían estar presentes en músculos masticatorios, con lo cual se podrá avanzar en la identificación del rol de estos receptores en la fisiología de los músculos masticatorios. Reconocer la relevancia de la señalización por ATP extracelular en fenómenos fisiológicos y/o patológicos que conlleven la remodelación muscular permitirá desarrollar opciones terapéuticas y moleculares para patologías del sistema músculo-esquelético en el aparato masticatorio.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El aparato masticatorio es una estructura altamente regulada y coordinada. Debido a esto, es susceptible a sufrir fenómenos adaptativos y/o patológicos que conllevan a cambios en la expresión génica.

El ATP extracelular se ha descrito como un mediador de señalización en múltiples procesos fisiológicos y patológicos. Se ha demostrado que esta molécula se libera de células musculares activas, y es un mediador relevante para los fenómenos de plasticidad y actividad del músculo esquelético. Las vías moleculares implicadas en este fenómeno han sido descritas en músculos de tronco y extremidades, donde se ha propuesto al ATP extracelular como un intermediario importante entre la despolarización del sarcolema y las señales de calcio que regulan la expresión génica. Los músculos masticatorios difieren de los músculos de tronco y extremidades, desde su origen embrionario hasta sus características morfológicas y bioquímicas, y por ello no es posible extrapolar los resultados obtenidos hasta la fecha en otros grupos musculares. La base molecular de la plasticidad muscular no se ha abordado en el aparato masticatorio, y se desconoce si la vía del ATP extracelular está involucrada en este proceso. Para dar respuesta a tal interrogante, es fundamental determinar si los componentes de esta vía de señalización están presentes en los músculos masticatorios y por ello, esta tesis se enfocó en la evaluación de la expresión de distintos subtipos de receptores purinérgicos P2Y en músculo masetero de ratón.

Esta línea de investigación general, y este trabajo en particular, tienen gran proyección bio-odontológica, pues en el sistema masticatorio se desconocen los mecanismos moleculares de la plasticidad muscular, que podrían explicar algunos trastornos temporomandibulares y ser blancos farmacológicos para tales efectos.

## **4. MARCO TEÓRICO**

### **4.1 Generalidades del músculo esquelético**

El músculo esquelético corresponde a un tejido altamente organizado diseñado para producir fuerza y regular diferentes funciones como el control postural, el movimiento y la respiración. Además, es capaz de remodelarse en respuesta a estímulos metabólicos, condiciones fisiológicas como el ejercicio y patológicas, en casos de injuria local o enfermedad sistémica (Blaauw y cols., 2013). En su estructura es posible observar un número variable de fibras musculares, que poseen un patrón estriado característico dado por la estructura sarcomérica que las conforma (Chromiak y cols., 2008). De acuerdo con la expresión de isoformas de la cadena pesada de miosina (MyHC, por su sigla en inglés), las fibras musculares se han clasificado en dos grandes grupos: tipo I y tipo II (Schiaffino y Reggiani, 2011). En general, las fibras tipo I expresan la isoforma MyHC-I, generan poca fuerza, tienen velocidad de contracción lenta, son resistentes a la fatiga muscular, tienen metabolismo oxidativo, gran cantidad de mitocondrias y menor diámetro respecto a las fibras tipo II. Por otro lado, las fibras tipo II expresan las isoformas MyHC-IIA, MyHC-IIX o MyHC-IIB, generan gran fuerza, tienen velocidad de contracción rápida, se fatigan más rápidamente, tienen metabolismo principalmente glicolítico, y son de mayor calibre que las fibras tipo I (Smerdu y cols., 1994; Weiss y cols., 1996; Pette y cols., 2002; Schiaffino y Reggiani., 2011). Además, se han descrito otros tipos de isoformas de la cadena pesada de miosina propias de músculo cardíaco, fetal (embrionaria y neonatal) y extraocular (Korfage y cols., 2005). Esta heterogeneidad de las fibras musculares que conforman el músculo estriado es lo que permite utilizar un mismo músculo para diversas tareas, desde la actividad continua de baja intensidad, como ocurre en el control postural hasta contracciones repetidas para que se genere el desplazamiento locomotor (Chromiak y cols., 2008; Casas y cols., 2014). Las propiedades estructurales y funcionales de las fibras musculares pueden cambiar en respuesta a influencias hormonales y neurales, siendo la actividad nerviosa, el

determinante principal en la expresión de un tipo de fibra en particular (Korfage y cols., 2005).

#### **4.1.1. Músculos masticatorios.**

Los músculos masticatorios corresponden a un subgrupo de músculos de cabeza y cuello que incluyen a los músculos masetero, pterigoideo lateral, pterigoideo medial, temporal, milohioideo y vientre anterior del digástrico que permiten el movimiento y mantención de la posición mandibular (Cavuoti y cols., 2016; Matarese y cols., 2016). Estos músculos son importantes para el desarrollo de una serie de actividades, entre las que se encuentran la masticación, deglución y fonación (Isola y cols., 2017). Si bien comparten aspectos generales de estructura y función con músculos de tronco y extremidades, también presentan múltiples características que los diferencian de ellos (Korfage y cols., 2005). La primera diferencia radica en el origen embrionario de ambos grupos musculares. Los músculos masticatorios se originan en el mesodermo paraxial, particularmente del primer arco faríngeo. Los músculos del tronco y las extremidades, en cambio, se originan del mesodermo somítico (Lewis y cols., 2013). Otra particularidad de los músculos masticatorios es la expresión diferencial de isoformas de MyHC. No sólo expresan las isoformas clásicas de MyHC tipo I y II, sino también MyHC de origen cardíaco (MyHC cardíaca  $\alpha$ ), e isoformas fetales (MyHC embrionaria y MyHC neonatal), que normalmente no se expresan durante la adultez en los músculos de tronco y extremidades. Además, presentan abundantes fibras híbridas, que expresan simultáneamente más de una isoforma de MyHC, a diferencia de los músculos del tronco y extremidades en que cada fibra expresa solo una isoforma (Schiaffino y Reggiani, 2011). Lo anterior podría responder a la gran variedad de funciones motoras que realizan los músculos masticatorios, y las óptimas propiedades que presentan estas fibras en términos de fuerza, velocidad de contracción y resistencia a la fatiga (Langenbach y cols., 2003; Korfage y cols., 2005).

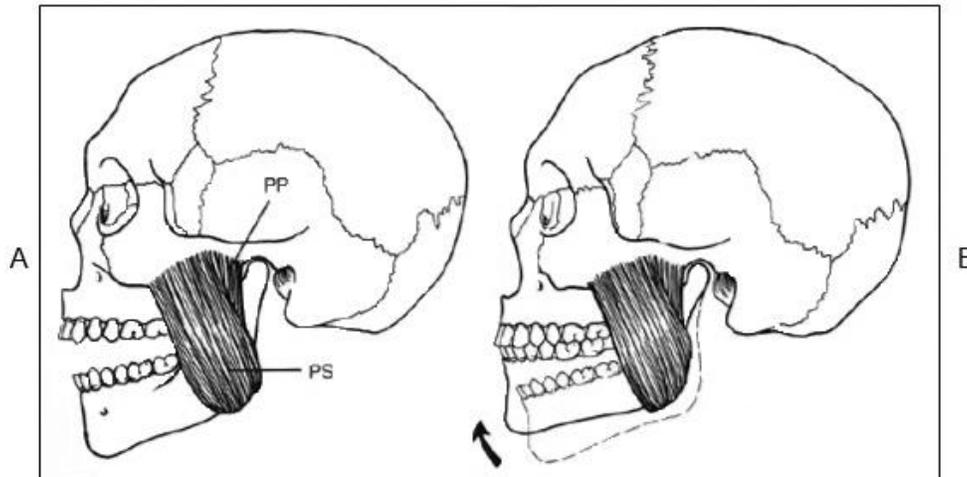
Se ha reportado que las características fenotípicas de los músculos masticatorios cambian frente a diferentes condiciones fisiopatológicas, como envejecimiento, morfología craneofacial, parálisis, consistencia de la dieta, respiración bucal, hábitos alimenticios, entre otras (Toniolo y cols., 2008; Grunheid y cols., 2009). El fenómeno de plasticidad en este sistema ha sido abordado a nivel funcional e histológico, pero en contraste a los músculos de tronco y extremidades, las vías de señalización implicadas en este proceso son desconocidas.

#### **4.1.2. Aspectos estructurales y funcionales del músculo masetero.**

El masetero es un músculo multipenado, corto, grueso y cuadrangular que se ubica en el tercio medio facial, específicamente en la región parótido-masetérica (Rouvière y cols., 2005). Está constituido por una porción superficial, la cual se origina de los 2/3 anteriores del arco cigomático, insertándose en el ángulo mandibular y en la zona lateral e inferior de la rama mandibular. La porción profunda que conforma este músculo se origina en el borde medial, posterior e inferior del arco cigomático con su inserción en la zona supero-lateral de la rama mandibular (Rouvière y cols., 2005). Algunos autores han descrito y reportado la existencia de un fascículo intermedio el cual se originaría en la porción medial y central del arco cigomático, insertándose a nivel de la cara externa de la rama mandibular, superior al fascículo superficial (Latarjet y cols., 2013). Se ha demostrado que, con el paso de la edad, algunas fibras de este fascículo migran a la porción profunda (Gaudy y cols., 2000).

La función principal del músculo masetero en la dinámica mandibular corresponde a la elevación de la mandíbula, aunque la porción superficial puede facilitar la protrusión y la porción profunda facilita la retrusión (Fig. 1; Okeson, 2013). Además, se ha sugerido que las fibras de la porción superficial se continúan con las fibras musculares del músculo pterigoideo medial, generando un “efecto

de cincha” entre ambos, el cual contribuiría a la función de cierre mandibular (Lang, 1995; Gaudy y cols., 2000). Sin embargo, aún no existe un consenso sobre ello (Isola y cols., 2017).



**Figura 1. Función del músculo masetero.**

Músculo masetero; PP, porción profunda. PS, porción superficial. Se muestra la disposición del músculo masetero durante el descenso (A) y la elevación mandibular (B) (Okeson, 2013).

Al existir una contracción coordinada de los músculos de cabeza y cuello para lograr una dinámica mandibular eficiente (Manns, 2013), el músculo masetero juega un rol fundamental en el correcto funcionamiento del sistema estomatognático, ya que su conformación estructural lo hace ser un músculo potente que proporciona la fuerza necesaria para una masticación eficiente (Okeson, 2013; Isola y cols., 2017).

Como se mencionó anteriormente, la presencia de diferentes tipos de fibras que conforman al músculo masetero sugiere una alta plasticidad funcional relacionada a la demanda específica a la cual responde (Kwa, 1995; Stiennen, 1996). Por este motivo, el músculo masetero es un buen modelo para estudiar rutas de señalización en músculos masticatorios ya que responde tempranamente

a los cambios en la actividad masticatoria relacionados tanto a los tipos y hábitos alimenticios, características craneofaciales, entre otros (Toniolo y cols., 2008).

## **4.2. Señalización por nucleótidos extracelulares.**

### **4.2.1. Generalidades**

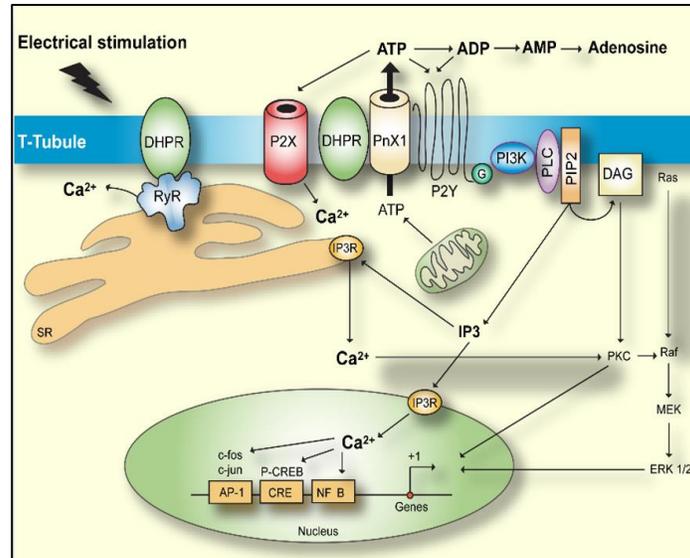
El ATP se consideró durante mucho tiempo como una molécula exclusivamente intracelular, involucrada con la producción de energía, la síntesis de ácidos nucleicos (ARN, ADN) y la generación de segundos mensajeros (AMP cíclico). Sin embargo, en los últimos años se ha propuesto un nuevo rol para el ATP como molécula de señalización autocrina y paracrina. El ATP se libera al medio extracelular de manera regulada, independiente de la lisis, a través de mecanismos que incluyen la exocitosis mediada por vesículas o la vía conductiva (transportadores ABC, canales activados por voltaje, canales de conexinas, canales de panexinas) (Gallagher y cols., 2002; Lazarowsky y cols., 2003). Además, se ha demostrado que constituye un mensajero relevante para la señalización autocrina y paracrina a través de su interacción con receptores purinérgicos. Se ha demostrado su participación en la comunicación entre neuronas y células gliales (Fields y cols., 2006), en agregación plaquetaria (Gachet, 2006), la modulación del tono vascular (Buvinic y cols., 2002; Buvinic y cols., 2006), el transporte de iones en epitelios (Schwiebert y cols., 2003) y la neurotransmisión en vías del dolor (Burnstock y cols., 2006), entre otros.

Existen dos familias de receptores de superficie para los nucleótidos extracelulares: P2X y P2Y. Los receptores P2X son canales iónicos activados por ATP, permeables de manera no selectiva a  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  (North, 2002). Los receptores P2Y son metabotrópicos, acoplados a proteína G, y se activan por ATP, ADP, UTP, UDP o UDP/UTP-glucosa (Abbracchio y cols., 2006). Farmacológica y molecularmente se han caracterizado siete subtipos de

receptores P2X (P2X<sub>1-7</sub>) y ocho subtipos de receptores P2Y (P2Y<sub>1, 2, 4, 6, 11, 12, 13,14</sub>) (Lenertz y cols., 2015). Estos subtipos tienen expresión diferencial en los distintos tejidos, y presentan diferente afinidad por sus ligandos (Abracchio y cols., 2006; Burnstock y cols., 2013)

#### **4.2.2. Señalización por nucleótidos extracelulares en músculo esquelético.**

En músculos de tronco y extremidades, se ha propuesto al ATP extracelular como un mediador fundamental entre la despolarización de la membrana de la célula muscular, las señales de calcio asociadas y los cambios en la expresión génica, a través del denominado “Acoplamiento Excitación-Transcripción (AET)”. Esto se ha demostrado tanto en miotubos en cultivo como en fibras musculares adultas de músculo *flexor digitorum brevis* (FDB) (Buvinic y cols., 2009; Jorquera y cols., 2013). En esta ruta de señalización, la despolarización de la membrana de la célula muscular es detectada por el receptor de dihidropiridinas (DHPR, Cav 1.1) presente en los túbulos T, promoviendo la salida de ATP al medio extracelular a través de canales de panexina 1 (Panx1). El ATP extracelular es rápidamente metabolizado a adenosina 5'-difosfato (ADP), adenosina 5'-monofosfato (AMP) y adenosina (Casas y cols., 2014), por medio de ectonucleotidasas localizadas en la superficie o en la matriz extracelular (Zimmermann y cols., 2012). El ATP y/o sus metabolitos activan receptores de tipo P2X y P2Y, generando ondas de calcio intracelular que modulan la expresión génica (Fig. 2) (Jorquera y cols., 2013; Bustamante y cols., 2014; Casas y cols., 2014; Fernández-Verdejo y cols., 2014). En fibras adultas de músculo FDB se ha demostrado la expresión de receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>13</sub> y P2Y<sub>14</sub> (Fernández-Verdejo y cols., 2014) y además se ha descrito la presencia de un complejo multiproteico involucrado con el AET, que asocia a DHPR, Panx1 y el receptor purinérgico P2Y<sub>2</sub> (Arias y cols., 2016).



**Figura 2. Modelo de Acoplamiento Excitación-Transcripción en músculo esquelético de tronco y extremidades.**

DHPR: Receptor de dihidropiridina. RyR: receptor de Rianodina, P2X: Receptor purinérgico P2X, P2Y: Receptor purinérgico P2Y, PnX1: Hemicanal de panexina. ATP: Adenosin trifosfato, ADP: Adenosin difosfato, AMP: Adenosin monofosfato, PI3K: Fosfatidil inositol 3-kinasa. PLC: Fosfolipasa C, PIP<sub>2</sub>: Fosfatidil inositol difosfato. DAG: Diacilglicerol, IP<sub>3</sub>: Inositol 3,4,5- trifosfato, IP<sub>3</sub>r: Receptor de IP<sub>3</sub>, Ca<sup>2+</sup>: Calcio. (Buvinic y cols., 2009)

En nuestro laboratorio, hemos determinado la presencia de DHPR, Panx1 y receptores purinérgicos de tipo P2Y<sub>2</sub> en músculo masetero de ratón, a nivel de ARNm y de proteína (Carolina Beato, tesis de doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad de Chile, en curso). No obstante, se desconoce la expresión de otros subtipos de receptores de tipo P2Y, que podrían estar involucrados en la señalización por ATP y sus metabolitos. Los músculos masticatorios presentan un origen, composición y arquitectura totalmente diferente a los músculos de tronco y extremidades, por lo que los antecedentes anteriormente descritos no se pueden extrapolar a este nivel. En todos los tejidos estudiados a la fecha, existen más de un subtipo de receptores P2X/P2Y co-expresados, lo que refuerza la idea de la relevancia de la señalización purinérgica, que requiere tener mecanismos de

acción redundantes y compensatorios frente a cualquier tipo de falla (May y cols., 2006; Orriss y cols., 2010; Lim y cols., 2012; Burnstock y cols., 2013; Valladares y cols., 2013). La identificación de los subtipos específicos de receptores P2Y expresados en los músculos masticatorios es de gran relevancia para determinar posteriormente el rol de la señalización por ATP extracelular en la remodelación y adaptación del aparato masticatorio en salud y enfermedad.

## **5. PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

Como parte de la línea de investigación global que evalúa la plasticidad muscular y la remodelación ósea en el sistema masticatorio a través de nucleótidos extracelulares, es necesario precisar una serie de caracterizaciones previas. Este trabajo en particular se centra en la expresión y distribución de receptores purinérgicos de tipo P2Y en músculo masetero de ratón, ya que, en dicha especie, la conformación y organización estructural y funcional en esta área es similar al humano, lo que permite que sea un modelo de elección para el estudio de los músculos masticatorios. (Baverstock y cols., 2013)

La identificación de los subtipos específicos de receptores P2Y expresados en los músculos masticatorios es de gran relevancia para determinar posteriormente el rol de la señalización por ATP extracelular en la remodelación y adaptación del aparato masticatorio en salud y enfermedad. Este proyecto, además de ser un engranaje de un proyecto mayor, sentará las bases para que posteriormente nuestro laboratorio aborde los mecanismos moleculares de plasticidad muscular en el sistema masticatorio, que son actualmente desconocidos.

## **6. HIPÓTESIS.**

El músculo masetero de ratón expresa diversos subtipos de receptores purinérgicos P2Y.

## **7. OBJETIVO GENERAL.**

Evaluar la expresión y la distribución celular de los distintos subtipos de receptores purinérgicos P2Y en músculo masetero de ratón.

## **8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- A) Determinar y comparar los niveles relativos de ARNm de los distintos subtipos de receptores P2Y en músculo masetero de ratón.
- B) Evaluar los niveles de expresión proteica y la distribución celular de los subtipos de receptores purinérgicos P2Y en músculo masetero de ratón.

## 9. METODOLOGÍA.

### 9.1. Estrategia experimental

**Modelo experimental:** Se utilizaron músculos maseteros de ratones BalbC machos de 6-8 semanas de edad, aislados y procesados inmediatamente para extracción de ARN total, extracción de proteínas o criocortes histológicos, según corresponda. Se utilizó un n=10 ratones para esta tesis. 4 animales fueron destinados a extracción de ARN y extracción de proteínas (músculos masetero derecho e izquierdo, respectivamente; para la extracción de proteínas solo se utilizó un n=3, el cuarto se utilizó para estandarización de la técnica). 6 animales fueron destinados a criocortes (músculo masetero derecho) y a la repetición de ensayos moleculares (músculo masetero izquierdo).

#### **Objetivo 1:**

*Determinar y comparar los niveles relativos de ARNm de los distintos subtipos de receptores P2Y en músculo masetero de ratón.*

Para determinar la presencia/ausencia del ARNm para los distintos subtipos de receptores P2Y en el músculo masetero, y comparar su expresión relativa, se extrajo el ARN total desde músculos maseteros de ratón aislados. Posteriormente, se llevó a cabo la transcripción reversa para obtener el ADNc. La determinación de los niveles de expresión de ARNm de los diferentes subtipos de receptores purinérgicos P2Y se analizó a través de PCR en tiempo real (qPCR) utilizando los partidores respectivos. Para lograr comparar la expresión entre los distintos subtipos de receptores, todos los partidores se utilizaron a concentraciones que aseguraran una eficiencia de 95-105% (previamente estandarizado en el laboratorio). Se utilizó un extracto de cerebro de ratón como control positivo de amplificación de todos los subtipos de receptores P2Y.

**Objetivo 2:**

*Evaluar los niveles de expresión proteica y la distribución celular de los subtipos de receptores purinérgicos P2Y en músculo masetero de ratón.*

Para determinar la presencia/ausencia de los distintos subtipos de receptores P2Y y su expresión relativa a nivel de proteína en músculo masetero de ratón, se extrajeron proteínas totales de los músculos aislados, se resolvieron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturantes (SDS/PAGE) y se visualizaron por inmunoblot con anticuerpos específicos (anti receptor P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub>, P2Y<sub>14</sub>). Los resultados fueron normalizados respecto de GAPDH como control de carga. Como control positivo para cada uno de los anticuerpos se utilizaron extractos de distintos tejidos de ratón (cerebro e hígado), de acuerdo con lo sugerido en la hoja técnica de cada anticuerpo.

Considerando que los ensayos anteriores se realizaron en extractos de músculo masetero completo, fue necesario validar la expresión de los receptores P2Y al interior de las fibras musculares. Esto debido a que el músculo tiene aporte de otros tipos celulares, tales como células vasculares (músculo liso/endotelio), neuronas motoras y sensoriales, fibroblastos, células inmunes, etc, que podrían ser la fuente de los receptores observados. Para resolver este punto, se realizaron criocortes transversales de músculo masetero aislado y se evaluó la expresión de los diferentes subtipos de receptores P2Y por inmunofluorescencia indirecta, utilizando anticuerpos primarios anti P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>12</sub> y P2Y<sub>14</sub>. Se realizó la co-tinción con caveolina 3, para establecer el perímetro de las fibras musculares y con tinción de Hoechst para identificar los núcleos. Estos ensayos permitieron, tener una idea acerca de la localización de los distintos subtipos de receptores en el músculo masetero.

## 9.2. Materiales y métodos

**Animales:** Se utilizaron 10 ratones BalbC machos de 6-8 semanas de edad, obtenidos de la Plataforma Experimental de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Se mantuvieron en este lugar en condiciones de temperatura y humedad controladas, con ciclos de luz-oscuridad de 12 h y acceso libre a agua y alimentos. Los protocolos para el manejo animal y los procedimientos experimentales han sido aprobados por el Comité de Bioética para Estudios en Animales de Experimentación (protocolo número FOUCH061501) y el Comité de Bioseguridad (protocolo número FDO N°61) de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, que se adjuntan como anexos.

Los animales se eutanasiaron por dislocación cervical, y se disecaron los músculos maseteros con micro-tijeras quirúrgicas. Los músculos se limpiaron rápidamente en tampón salino tris-base (TBS; Tris-Cl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.6) y luego se procesaron para aislamiento de ARNm, proteínas, o criocortes, según corresponda. En algunos de los animales además se disecaron cerebro e hígado, para utilizarlos como control positivo de expresión de los distintos subtipos de receptores.

**Extracción y cuantificación de ARN total:** El ARN total de músculo masetero de ratón fue obtenido empleando el reactivo Trizol® (Invitrogen - Life Technologies), de acuerdo con el protocolo propuesto por el fabricante. El ARN precipitado fue resuspendido en 12 µL de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas. Se realizó un tratamiento con DNAasa (Ambion- Life Technologies) durante 30 min para eliminar las trazas de ADN genómico. Este paso es fundamental, dado que los genes de los receptores P2Y no poseen intrones. Se determinó la concentración de ARN por espectrofotometría, realizando la lectura de absorbancia a 260 nm. La pureza de la extracción se evaluó mediante la relación de absorbancia 260/280 nm.

**Transcripción reversa y PCR tiempo real (RT-qPCR):** Para la reacción de transcripción reversa se utilizó la enzima SuperScript II (Invitrogen - Life

Technologies). Se incubó una mezcla de 1 µg de RNA (llevado a 10 µL con H<sub>2</sub>O sin nucleasas), 1 µL de poli-dT 10 mM y 1 µL dNTPs 10 mM, durante 5 min a 70 ° C. Posteriormente, los tubos se enfriaron en hielo durante 1 min y se adicionó una segunda mezcla (4 µL First Strand Buffer 5x, 2 µL DTT 0.1 M, 0.5 µL transcriptasa inversa SuperScript II, 1.5 µL H<sub>2</sub>O sin nucleasas). La síntesis de ADNc se realizó incubando a 42°C durante 60 min y luego a 70°C por 15 min. Luego de la obtención del ADNc, se realizó PCR en tiempo real para determinar los niveles de ARNm de los receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub>, P2Y<sub>14</sub> en músculo masetero y cerebro, el cual se utilizó como control positivo. Se utilizaron los partidores especificados en la tabla 1 (Hayato y cols., 2007; Buvinic y cols., 2009; Fernández-Verdejo y cols., 2014). Para el PCR en tiempo real, se utilizó el equipo Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies) y el kit qPCR Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 12 µL, siguiendo las recomendaciones indicadas por el proveedor. Las concentraciones finales de cada partidore se estandarizaron previamente en el laboratorio para asegurar una eficiencia de 95-105%, las cuales se detallan en la tabla 1. El protocolo de amplificación fue el siguiente: 95°C por 20 s y luego 40 ciclos de 95°C por 3 s (desnaturación) y 60°C (hibridación/extensión) por 30 s. Los valores fueron normalizados a la expresión del gen que codifica para GAPDH y analizados bajo el método de  $2^{-\Delta\Delta CT} \pm S.E.M$  (Pfaffl, 2001). Para cada partidore se obtuvo su valor de umbral de ciclos Ct (cycle threshold) que representa el número de ciclos necesarios para que alcancen un umbral de señal de fluorescencia. La comparación de Ct entre las muestras permite reconocer la diferencia en el total de moléculas de ADN o ADNc específico a evaluar, ya que mientras mayor cantidad de ADN blanco exista en la muestra, menor será el número de ciclos (Ct) que se requiere para alcanzar este umbral, pudiendo estimar la cantidad relativa de ARNm a partir de este valor. Por otro lado, el concepto de NTC (Not Template Control) corresponde al control blanco de la técnica (reacción en ausencia de muestra; sin ADNc).

ADNc	Partidor Sentido (5'-3')	Partidor Antisentido (5'-3')	Concentración final nM
P2Y <sub>1</sub>	AGGAAAGCTTCCAGGAGGAG	CGTGTCTCCATTCTGCTTGA	400
P2Y <sub>2</sub>	GTCAGCAGTGACGACTCAAGAC	TCAGAGGATATCAGCCCCTTTA	600
P2Y <sub>4-a</sub>	AGGAAGCAGCAGAACACCAT	CAAGGAGTCTGCACTGGTCA	600
P2Y <sub>4-b</sub>	GCTCTTTGGCTTTCCCTTCT	GTCCCCCGTGAACAGATAGA	600
P2Y <sub>4-c</sub>	AGCCCAAGTTCTGGAGATGGTG	GGTGGTTCCATTGGCATTGG	600
P2Y <sub>6</sub>	TTCCATCTTGCATGAGACAGAC	GCTTGAAATCCTCACGGTAGAC	600
P2Y <sub>12</sub>	CCTGTGCGTCAGAGACTACAAG	GGATTTACTGCGGATCTGAAAG	600
P2Y <sub>13</sub>	GGCCACTAGATGTCACCTTTTC	GATGGTGGGGTGGTAACTAGAA	600
P2Y <sub>14</sub>	GGAATTCTCTCTTCCGAATCCT	TGTTTCATCTTCTCACCTCTGGA	600
GAPDH	CAACTTTGGCATTGTGGAAG	CTGCTTCACCACCTTCTTG	400

**Tabla 1. Partidores utilizados en la técnica de qPCR para amplificar ADNc derivados de ARNm para receptores purinérgicos de tipo P2Y.**

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

**Inmunoblot:** Diferentes tejidos de ratón (músculo masetero, cerebro, pulmón, hígado y testículo) se disgregaron y lisaron en tampón de lisis (20mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 10% glicerol, 10mM EGTA, 2% SDS) suplementado con inhibidores de proteasas (cóctel inhibidor de proteasas Calbiochem SetIII 1:200, PMSF 1 mM). Los extractos se sonicaron por 3 min a temperatura ambiente (Cientec, Elmasonic E 30 H), se incubaron 30 min en hielo, y se centrifugaron a 14500 g a 4°C. La concentración de proteína de los sobrenadantes se determinó con Coomassie Plus™ Protein Assay (Thermo Fisher, E.E.U.U.) usando albúmina bovina como estándar. Se resuspendieron 20 µg de proteínas de cada lisado en tampón de carga.

Para una primera aproximación de presencia/ausencia de los subtipos de receptores se realizó la técnica de “dot blot”. Se activaron membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) en metanol durante 3 min. Luego, se demarcó la región

correspondiente a cada muestra y se cargaron 2  $\mu$ L de cada una en el área designada por 5 min. Las membranas se bloquearon a temperatura ambiente durante 1 h en tampón TBS suplementado con leche descremada 3% y Tween-20 0.5%. Luego, fueron incubadas con los anticuerpos primarios correspondientes (Tabla 2) durante 30 min a temperatura ambiente. Las membranas fueron lavadas con una solución de TBS-Tween-20 1% (3 veces, 3-5 min) y luego incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) (Anti-cabra HRP, anti-conejo HRP; Tabla 2), a temperatura ambiente durante 1 h. Una vez completada esta etapa, las membranas fueron lavadas con una solución de TBS-Tween-20 1% a temperatura ambiente en agitación constante (3 veces, 15 min). La visualización de la marca quimioluminiscente se realizó con el kit Rapid Step™ ECL Reagent (Calbiochem) en el equipo Amersham Imager 600 RGB (GE Healthcare Life Sciences).

Las muestras con marca positiva en dot blot, se analizaron posteriormente por inmunoblot para corroborar el tamaño de la proteína y la especificidad de la marca. Las proteínas se resolvieron por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12%. Las proteínas fueron luego transferidas a membranas de PVDF a 400 mA por 90 min. Las membranas se bloquearon a temperatura ambiente durante 1 h en TBS suplementado con leche descremada 3% y Tween-20 0.5%. Luego fueron incubadas con los anticuerpos primarios correspondientes (Tabla 2) durante toda la noche a 4°C o bien a temperatura ambiente durante 2 h, dependiendo del anticuerpo utilizado. Las membranas fueron lavadas con una solución TBS-Tween-20 1% (3 veces, 10 min) y luego incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con HRP, a temperatura ambiente durante 1 h. Una vez completada esta etapa las membranas fueron lavadas con una solución TBS-Tween-20 0.5% a temperatura ambiente en agitación constante (3 veces, 10 min). La visualización de la marca quimioluminiscente se realizó con el kit Rapid Step™ ECL Reagent, Calbiochem en el equipo Amersham Imager 600 RGB (GE Healthcare Life Sciences). 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 0.05% por 30 min en agitación constante a temperatura ambiente). Luego, fueron lavadas dos veces con PBS por 10 min y posteriormente lavadas dos veces con TBS-T por 5 min. Las membranas se bloquearon y se incubaron con un anticuerpo contra la proteína gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), utilizada como control de carga. Las imágenes fueron procesadas con el programa ImageJ.

Receptor	Anticuerpo primario	Concentración de uso del anticuerpo primario	Tiempo de incubación anticuerpo primario	Anticuerpo secundario (DB y WB)	Anticuerpo secundario (IF)	Concentración de uso del anticuerpo secundario	Tiempo de incubación anticuerpo secundario	Peso esperado de la proteína	Tejido control positivo
P2Y <sub>1</sub>	Santa Cruz sc-20123	DB: 1:1000 IB: 1:1000 IF: 1:200	DB: 30 min IB: 16-18 h IF: 16-18 h	Santa Cruz anti-conejo IgG-HRP sc-2004	Mol. Probes anti-conejo Alexa Flúor 488	DB: 1:7000 IB: 1:7000 IF: 1:500	DB: 1 h IB: 1 h IF: 1 h - 37°C	45 kDa	Hígado
P2Y <sub>2</sub>	Santa Cruz sc-20124	DB: 1:1000 IB: 1:1000 IF: 1:200	DB: 30 min IB: 16-18 h IF: 16-18 h	Santa Cruz anti-conejo IgG-HRP sc-2004	Mol. Probes anti-conejo Alexa Flúor 488	DB: 1:7000 IB: 1:7000 IF: 1:500	DB: 1 h IB: 1 h IF: 1 h - 37°C	42 kDa	Cerebro
P2Y <sub>4</sub>	Santa Cruz sc-17634	DB: 1:1000 IB: 1:1000 IF: 1:200	DB: 30 min IB: 16-18 h IF: 16-18 h	Santa Cruz anti-cabra IgG-HRP: sc-2020	Mol. Probes anti-cabra Alexa Flúor 488	DB: 1:1000 IB: 1:1000 IF: 1:500	DB: 1 h IB: 1 h IF: 1 h - 37°C	40 kDa	Cerebro
P2Y <sub>6</sub>	Santa Cruz sc-20127	DB: 1:1000 IB: 1:1000 IF: 1:200	DB: 30 min IB: 16-18 h IF: 16-18 h	Santa Cruz anti-conejo IgG-HRP sc-2004	Mol. Probes anti-conejo Alexa Flúor 488	DB: 1:7000 IB: 1:7000 IF: 1:500	DB: 1 h IB: 1 h IF: 1 h - 37°C	36 kDa	Cerebro
P2Y <sub>12</sub>	Santa Cruz sc-27152	DB: 1:1000 IB: 1:1000 IF: 1:200	DB: 30 min IB: 16-18 h IF: 16-18 h	Santa Cruz anti-cabra IgG-HRP: sc-2020	Mol. Probes anti-cabra Alexa Flúor 488	DB: 1:1000 IB: 1:1000 IF: 1:500	DB: 1 h IB: 1 h IF: 1 h - 37°C	44 kDa	Cerebro
P2Y <sub>13</sub>	Santa Cruz sc-69526	DB: 1:1000 IB: 1:1000	DB: 30 min IB: 16-18 h	Santa Cruz anti-cabra IgG-HRP: sc-2020	-	DB: 1:1000 IB: 1:1000	DB: 1 h IB: 1 h	41 kDa	Cerebro
P2Y <sub>14</sub>	Santa Cruz sc-48189	DB: 1:1000 IB: 1:1000 IF: 1:200	DB: 30 min IB: 16-18 h IF: 16-18 h	Santa Cruz anti-cabra IgG-HRP: sc-2020	Mol. Probes anti-cabra Alexa Flúor 488	DB: 1:1000 IB: 1:1000 IF: 1:500	DB: 1 h IB: 1 h IF: 1 h - 37°C	39 kDa	Cerebro
GAPDH	Santa Cruz sc-365062	IB: 1:1000	IB: 1 h	Santa Cruz anti-ratón IgG-HRP: sc-2005	-	IB: 1:7000	IB: 1 h	37 kDa	Cerebro
Caveolina 3	BD Biosciences-610421	IF: 1:200	IF: 16-18 h	-	Mol. Probes anti-ratón Alexa Flúor 555	IF: 1:500	IF: 1 h - 37°C	-	Sarcolema

**Tabla 2. Características de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados para las técnicas de dot blot, inmunoblot e inmunofluorescencia de los distintos subtipos de receptores P2Y en músculo masetero de ratón.**

DB: Dot blot, IB: Inmunoblot, IF: Inmunofluorescencia.

**Inmunofluorescencia indirecta:** Se diseccionaron los músculos masetero de ratón y se congelaron inmediatamente durante 1 min realizando un protocolo de isopentano/nitrógeno líquido (Jeftinija y cols., 2007). Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento. Se obtuvieron secciones transversales congeladas de 12 µm de grosor, utilizando un criostato a -18°C. A continuación, estas secciones se lavaron con buffer fosfato salino (PBS; NaCl 137mM, KCl 2,7 mM, NaHPO<sub>4</sub> hepta hidratado 10mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM, pH 7.4) y se fijaron con paraformaldehído (Electron Microscopy Science) 3% v/v en PBS durante 20 min. Posteriormente, las muestras se lavaron con PBS y se incubaron durante 10 min con una solución glicina 100 mM en PBS. La permeabilización de la membrana se realizó con Tritón X-100, 0.1% (10 min) en PBS y luego se bloqueó por 30 min con PBS-BSA 4% p/v. Finalmente, las muestras fueron incubadas con anticuerpo primario correspondiente (Tabla 2) durante 16-18 h a 4°C en cámara húmeda, para luego ser lavadas con PBS e incubadas con el anticuerpo secundario Alexa Fluor-488 (anti-cabra o anti-conejo; Tabla 2) o Alexa Fluor-555 (anti-ratón, Tabla 2) durante 1 h a 37°C. La tinción de núcleos se realizó mediante tinción de Hoechst por 30 min a temperatura ambiente. El montaje se realizó con el reactivo anti-fading Dako (Dako, Dinamarca). Las inmunofluorescencias fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia Nikon Ti-E y procesadas mediante el programa ImageJ. (National Institute of Health NIH, EE. UU).

### **9.3 Presentación y análisis estadístico**

Los resultados fueron presentados como Promedio ± Error Estándar del Promedio del número de experimentos independientes indicados (n) o como ejemplo representativo de experimentos realizados de forma independiente. Las comparaciones entre los grupos se realizaron mediante la prueba de Kruskal Wallis, en donde se comparó la expresión de todos los receptores con relación al receptor de menor expresión (P2Y<sub>14</sub>) y test HSD de Tukey para comparaciones

múltiples a través del programa GraphPad Prism5. Se consideró  $p < 0.05$  como límite de significancia.

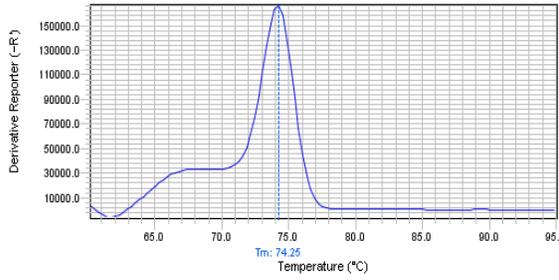
## 10. RESULTADOS

### 1. *Determinación y comparación de los niveles relativos de ARNm de los distintos subtipos de receptores P2Y en músculo masetero de ratón.*

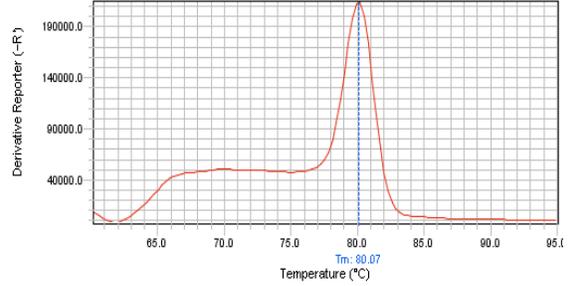
Para validar los partidores a utilizar, se analizó su comportamiento amplificando ADNc derivado de extracto de cerebro total, que es un control positivo para la expresión de los distintos subtipos de receptores P2Y. Se analizaron las curvas de disociación de las reacciones de qPCR con cada pareja de partidores, para validar que se amplificara un producto único, reflejado por la aparición de un pico preferencial. Esto fue así para los subtipos de receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> y P2Y<sub>14</sub> (Fig. 3). Sin embargo, en el caso del receptor P2Y<sub>4</sub>, ninguna de las tres parejas distintas de partidores analizados (P2Y4-a, P2Y4-b, P2Y4-c) presentó un pico claro amplificado (Fig. 3). Lo mismo anterior ocurrió cuando se analizaron las muestras de músculo masetero.

Además de evaluar las correctas curvas de disociación, el criterio para confirmar la presencia de ARNm de cada receptor fue que el Ct de amplificación de sus partidores fuera 5 o más ciclos menores que su NTC (control negativo; reacción sin ADNc templado). Con este criterio, en músculo masetero se confirmó la expresión de receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>12</sub> y P2Y<sub>14</sub> (Fig. 4). Al comparar la expresión relativa de todos los receptores entre sí, se demostró que P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>12</sub> presentaron una expresión de ARNm significativamente mayor al resto de los subtipos (Tabla 3).

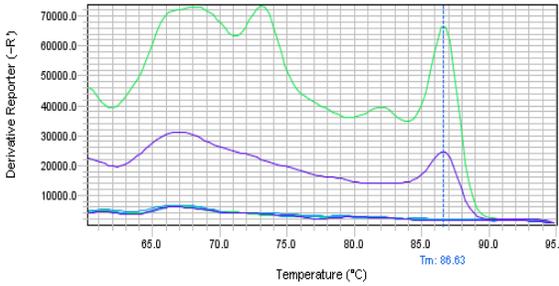
### P2Y<sub>1</sub>



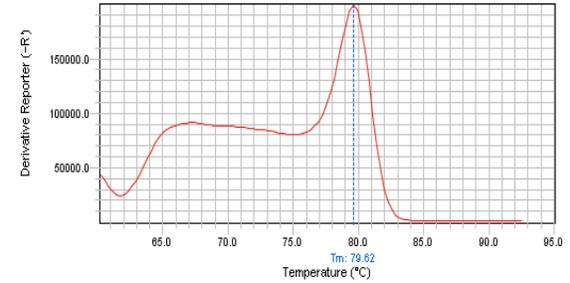
### P2Y<sub>2</sub>



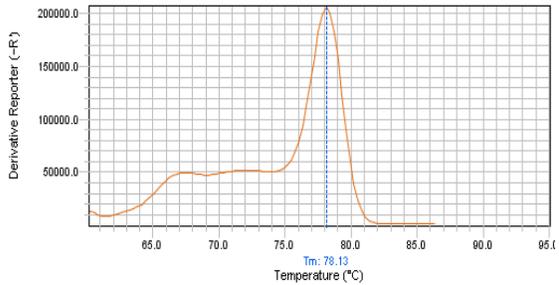
### P2Y<sub>4</sub>



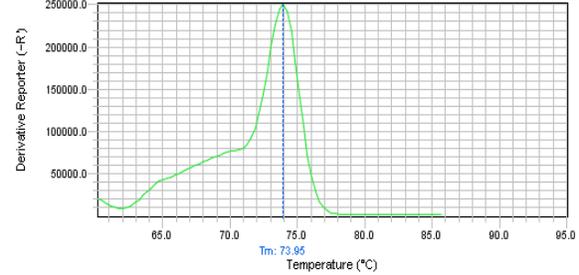
### P2Y<sub>6</sub>



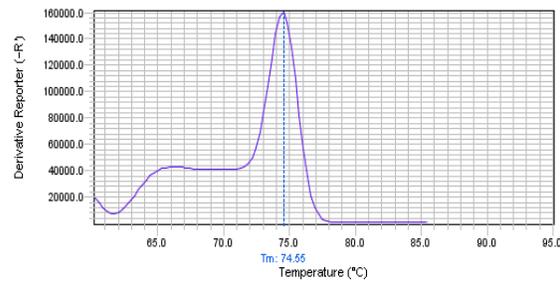
### P2Y<sub>12</sub>



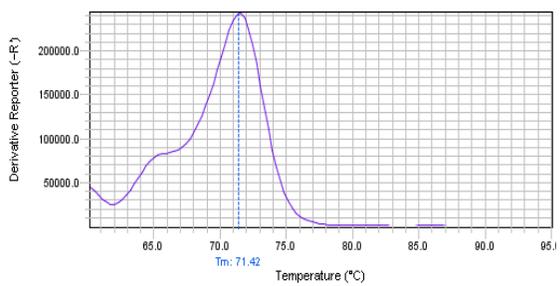
### P2Y<sub>13</sub>



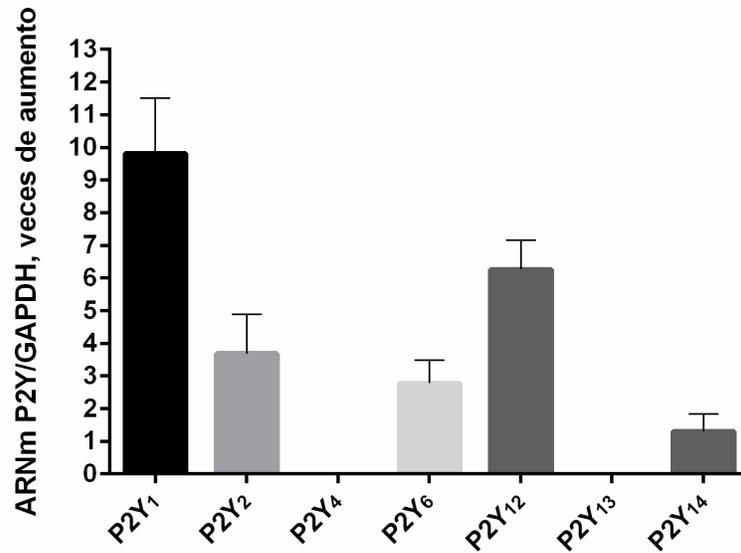
### P2Y<sub>14</sub>



### GAPDH



**Figura 3. Curvas de disociación para la amplificación de distintos subtipos de receptores P2Y.** Se muestra una curva de disociación representativa para cada pareja de partidores, amplificando los subtipos de receptores P2Y en una muestra de cerebro de ratón. En el caso del receptor P2Y<sub>4</sub>, ninguna de las 3 parejas de partidores ensayadas amplificó un producto específico. (Verde: P2Y<sub>4</sub>-a, Morado: P2Y<sub>4</sub>-b, Azul: P2Y<sub>4</sub>-c)



**Figura 4. Expresión relativa de ARNm de distintos subtipos de receptores P2Y en músculo masetero de ratón.**

La evaluación de los niveles de ARNm se realizó a través de qPCR. Cada muestra se normalizó respecto de la amplificación de GAPDH. Las muestras entre sí se normalizaron respecto del receptor con mínima expresión detectable (P2Y<sub>14</sub>). No se detectó expresión de los receptores P2Y<sub>4</sub> y P2Y<sub>13</sub>. Los datos se muestran como promedio  $\pm$  error estándar, n=4.

Expresión de ARNm de receptores P2Y	P2Y <sub>2</sub>	P2Y <sub>6</sub>	P2Y <sub>12</sub>	P2Y <sub>13</sub>	P2Y <sub>14</sub>
P2Y <sub>1</sub>	***	****	n.s	****	****
P2Y <sub>2</sub>	-	n.s	n.s	n.s	n.s
P2Y <sub>6</sub>	-	-	n.s	n.s	n.s
P2Y <sub>12</sub>	-	-	-	***	**
P2Y <sub>13</sub>	-	-	-	-	n.s

**Tabla 3. Comparación de los niveles de ARNm de los distintos receptores P2Y en músculo masetero de ratón**

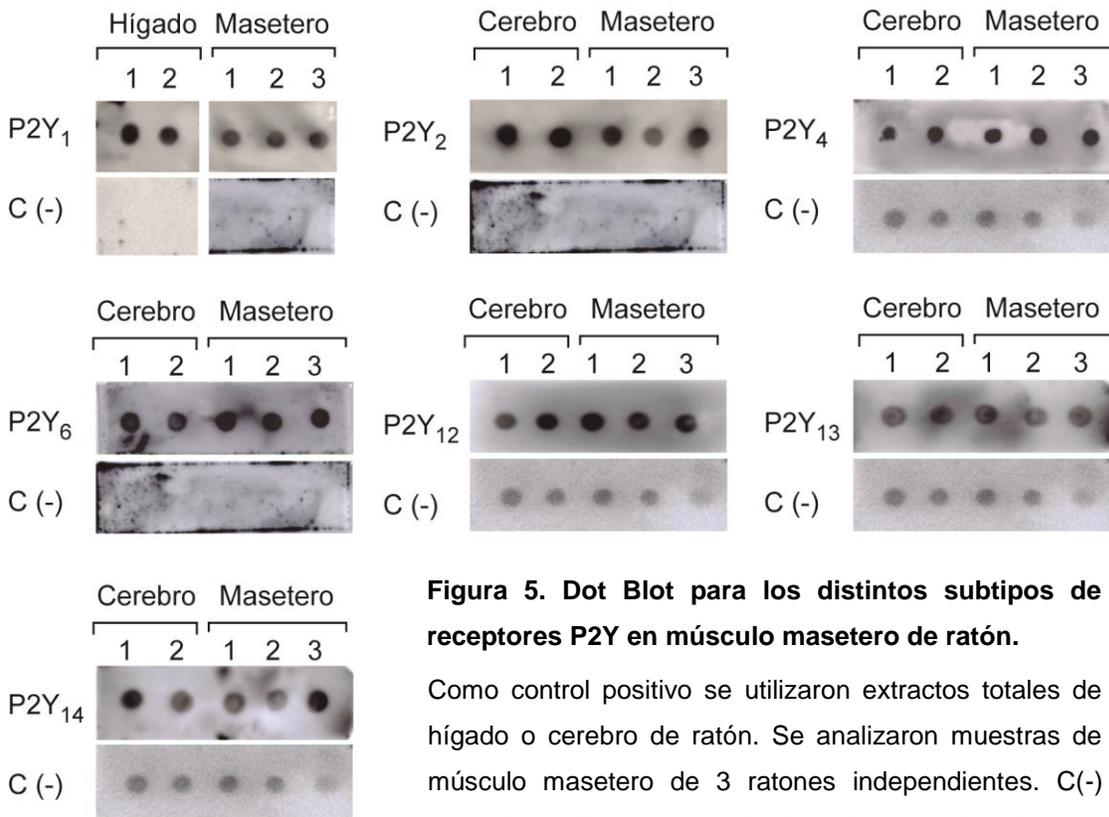
El análisis de los resultados se llevó a cabo a través de test HSD de Tukey para comparar los niveles de expresión de ARNm de todos los receptores P2Y entre sí. \*\*, p< 0.01; \*\*\*, p<0.001; \*\*\*\*, p< 0.0001. n=4

2. *Evaluación de la expresión proteica y la distribución celular de los subtipos de receptores purinérgicos P2Y en músculo masetero de ratón.*

Como una primera aproximación para sugerir la presencia/ausencia de receptores P2Y en músculo masetero, se realizó la técnica de dot blot. Ésta no requiere la resolución de las proteínas en un gel, sino sólo la absorción de muestras de un extracto total de proteínas en una membrana de PVDF y su posterior determinación con anticuerpos específicos para la proteína a analizar. Se encontró marca positiva para todos los subtipos de receptores P2Y analizados (Fig. 5). Como control positivo se evaluó la presencia de los receptores en extractos de hígado o cerebro, como se indica en la figura 5. Como control negativo de la técnica se utilizó el marcaje en ausencia de anticuerpo primario. Esto demostró que, mientras el anticuerpo secundario anti-conejo (utilizado para los receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>6</sub>) da un control negativo muy limpio, el anticuerpo secundario anti-cabra (utilizado para los receptores P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub>, P2Y<sub>14</sub>) presenta cierto grado de marca inespecífica. Sin embargo, la marca en presencia de los anticuerpos primarios siempre fue de mayor intensidad que el control negativo (Fig. 5).

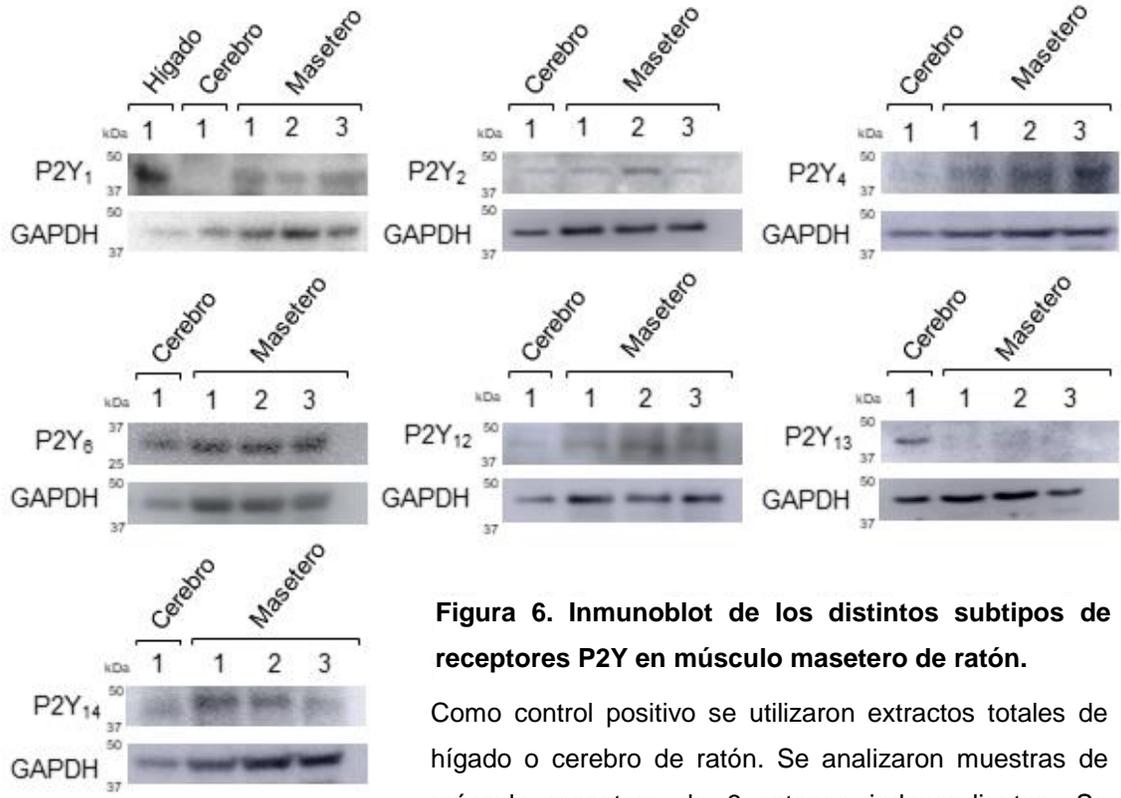
Para validar la expresión de los distintos receptores P2Y, se resolvieron las proteínas de extractos totales de músculo masetero mediante SDS-PAGE, y se realizó inmunoblot con los anticuerpos correspondientes, para evaluar la presencia de las proteínas del tamaño esperado. Se utilizaron extractos totales de distintos tejidos como control positivo. Se demostró la expresión de los subtipos de receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>12</sub>, y P2Y<sub>14</sub> (Fig. 6). En el caso del receptor P2Y<sub>13</sub>, solo se aprecia marcaje en el tejido control utilizado (cerebro) y ausencia de marcaje en las 3 muestras de músculo masetero. En el inmunoblot para los receptores P2Y<sub>12</sub> y P2Y<sub>14</sub> se obtuvieron varias bandas de distintos tamaños; sin embargo, de acuerdo con el resultado del dot blot se sabía que el anticuerpo secundario anti-cabra originaba una marca no específica. Es por esto

que se realizó el inmunoblot en ausencia de anticuerpo primario, solo incubando con el anticuerpo anti-cabra-HRP, y se detectó la aparición de bandas inespecíficas (Fig. 7). Sin embargo, el patrón de bandas obtenido con los anticuerpos anti P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>12</sub> y P2Y<sub>14</sub> muestra una banda diferencial al peso esperado, que no aparece en el control negativo (Fig. 7).



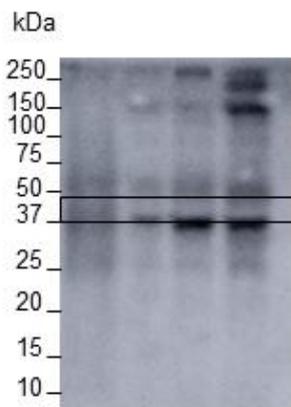
**Figura 5. Dot Blot para los distintos subtipos de receptores P2Y en músculo masetero de ratón.**

Como control positivo se utilizaron extractos totales de hígado o cerebro de ratón. Se analizaron muestras de músculo masetero de 3 ratones independientes. C(-) control negativo en ausencia de anticuerpo primario.



**Figura 6. Inmunoblot de los distintos subtipos de receptores P2Y en músculo masetero de ratón.**

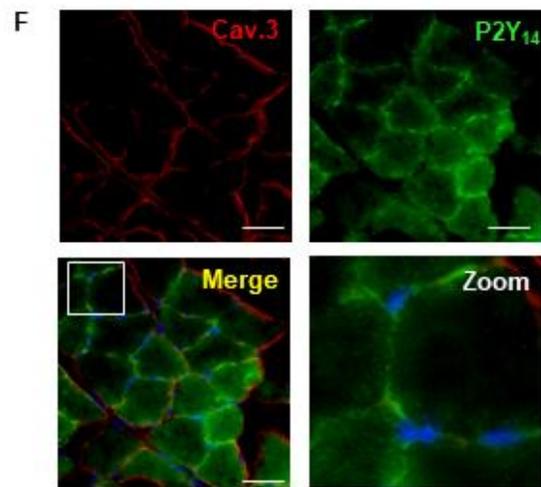
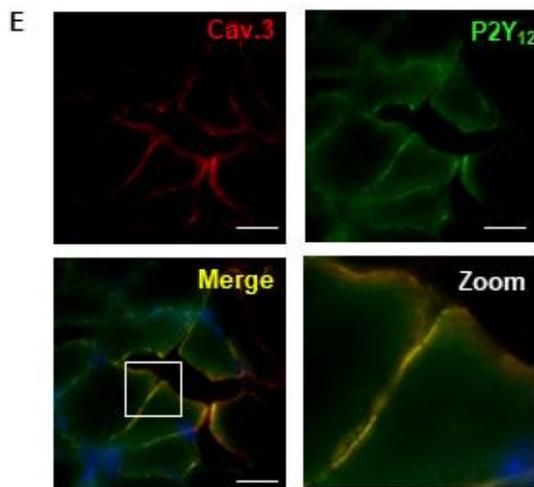
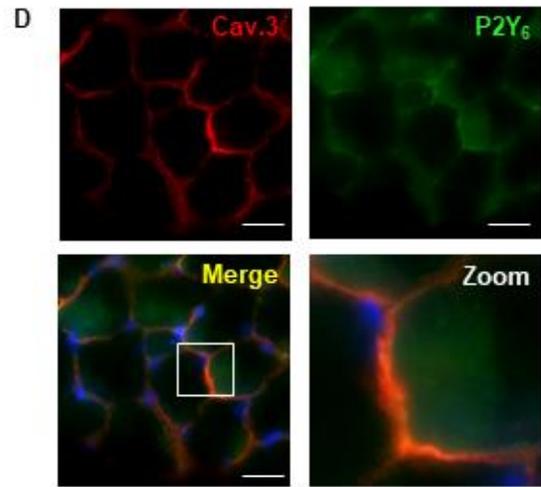
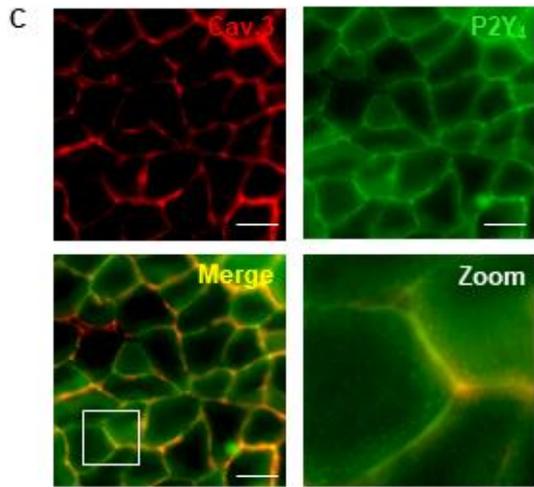
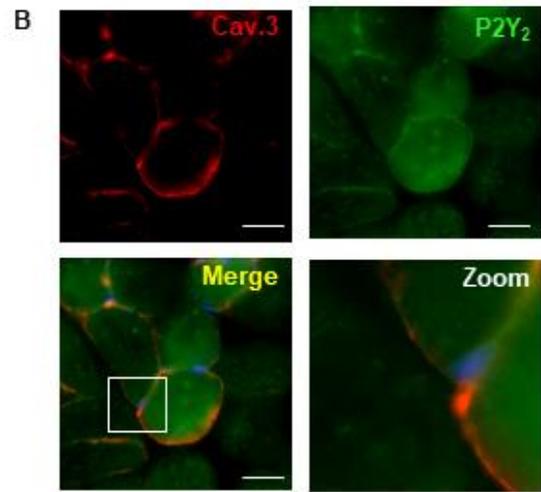
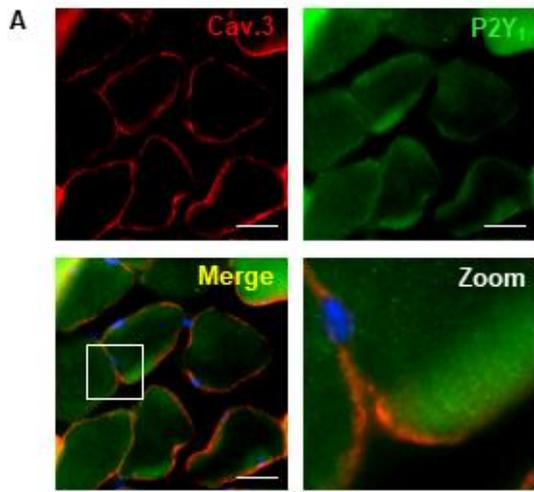
Como control positivo se utilizaron extractos totales de hígado o cerebro de ratón. Se analizaron muestras de músculo masetero de 3 ratones independientes. Se muestra un blot representativo de un n=3.



**Figura 7. Inmunoblot con ausencia de anticuerpo primario y solo incubado anticuerpo secundario anti-cabra-HRP.**

Se detectan bandas inespecíficas, especialmente fuera del área comprendida entre los 50 y 37 kDa.

Considerando que los ensayos anteriores se realizaron en extractos de músculo masetero completo, que presenta varios tipos celulares (fibras musculares, fibroblastos, terminales nerviosos, células de vasos sanguíneos), fue necesario validar la expresión de los receptores P2Y en las fibras musculares. Se realizaron criocortes transversales de músculo masetero aislado y se evaluó la ubicación de los diferentes subtipos de receptores P2Y por inmunofluorescencia indirecta y microscopía de epifluorescencia. En cada caso se realizó una co-tinción contra caveolina 3, para identificar los límites de cada fibra muscular (sarcolema) y tinción de Hoechst para marcar los núcleos celulares. Con esta técnica se demostró la expresión de los 6 subtipos de receptores P2Y previamente identificados por inmunoblot: P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>12</sub> y P2Y<sub>14</sub> (Fig. 8). En el caso del receptor P2Y<sub>1</sub>, se observó una marca punteada exclusivamente al interior de las fibras, y no en el sarcolema. Los demás subtipos también presentaron dicho punteado, pero además mostraron tinción a nivel de sarcolema (Fig. 8). Como control negativo se realizaron inmunofluorescencias en ausencia de anticuerpo primario, para detectar cualquier tipo de marca inespecífica generada por el anticuerpo secundario. Las imágenes fueron adquiridas en las condiciones de exposición en que el control negativo no presentara marca (no mostrado).



**Figura 8. Distribución celular de los receptores P2Y en músculo masetero de ratón.**

El músculo masetero de ratón fue crioseccionado (cortes transversales de 12  $\mu\text{m}$ ) y teñido con anticuerpos fluorescentes contra los distintos subtipos de receptores P2Y: **A.** P2Y<sub>1</sub>, **B.** P2Y<sub>2</sub>, **C.** P2Y<sub>4</sub>, **D.** P2Y<sub>6</sub>, **E.** P2Y<sub>12</sub>, **F.** P2Y<sub>14</sub>. Se utilizó para cada caso el anticuerpo secundario correspondiente, acoplado a Alexa 488 (verde). En cada muestra se marcó paralelamente caveolina 3 (Cav.3, anticuerpo secundario acoplado a Alexa Fluor 555, rojo) y se tiñeron los núcleos con Hoechst (azul). En cada panel, se muestra la imagen de Cav.3, receptor P2Y, la composición de ambos junto con la tinción de Hoescht (Merge) y una ampliación de la zona delimitada por el cuadrado (Zoom). La barra de escala corresponde a 20  $\mu\text{m}$ . Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio de epifluorescencia Ti-E Nikon (60X) y procesados usando el software ImageJ.

## 11. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se caracterizó la expresión de distintos subtipos de receptores purinérgicos P2Y en músculo masetero de ratón. Los resultados obtenidos demostraron la expresión de los subtipos P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>12</sub>, y P2Y<sub>14</sub>, como se resume en la Tabla 4.

Distintos estudios han demostrado la expresión de receptores purinérgicos de tipo P2Y en diversos tejidos como páncreas, intestino delgado, estómago, hígado, sistema nervioso, entre otros (Von Kügelgen y Hoffmann., 2016). En el sistema masticatorio, se ha estudiado que el estrés mecánico permite la activación de receptores P2Y<sub>6</sub>, promoviendo la liberación de interleuquina 6 (IL-6) en el tejido pulpar (Satrawaha y cols., 2011; Lim y cols., 2012). En el ligamento periodontal se ha descrito el rol fundamental del receptor P2Y<sub>1</sub> en el aumento de la expresión de osteopontina (OPN) y RANKL bajo estrés mecánico. (Lim y Mitchell, 2012). Hasta la fecha, no existen antecedentes de la presencia/ausencia de estos receptores en músculos masticatorios, y aunque han sido descritos en músculos de tronco y extremidades (Fernández-Verdejo y cols., 2014; Arias y cols., 2016) los resultados no pueden extrapolarse a los músculos de cabeza y cuello dadas las diferencias anatómicas y bioquímicas existentes entre estos dos grupos musculares.

La función de los receptores P2Y se ha asociado a fenómenos de plasticidad muscular (Buvinic y cols., 2009) y, considerando que los músculos masticatorios responden a cambios adaptativos y patológicos, es interesante conocer si estos receptores se encuentran presentes en este grupo muscular participando en los fenómenos de remodelación del aparato masticatorio.

Los resultados de este trabajo dan cuenta que en músculo masetero de ratón se expresa ARNm de los subtipos P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>12</sub> y P2Y<sub>14</sub>. Tanto los subtipos expresados como el nivel comparativo de expresión entre ellos varían

respecto de lo descrito previamente por nuestro grupo en músculo FDB de ratón (Fernández-Verdejo y cols., 2014). A diferencia de lo encontrado en músculo FDB, en músculo masetero no se detectó expresión del ARNm del receptor P2Y<sub>13</sub>, y sí se detectó expresión del ARNm del receptor P2Y<sub>6</sub>. Mientras que en FDB el nivel de expresión de los ARNm fue P2Y<sub>2</sub>>P2Y<sub>14</sub>>>P2Y<sub>1</sub>>P2Y<sub>13</sub>>P2Y<sub>4</sub>=P2Y<sub>12</sub>, en músculo masetero encontramos expresión de los ARNm en la razón P2Y<sub>1</sub>>P2Y<sub>12</sub>>P2Y<sub>2</sub>=P2Y<sub>6</sub>=P2Y<sub>14</sub>. Cabe destacar que, mientras que en músculo FDB hay cerca de 7000 veces de diferencia en el nivel de ARNm entre el receptor P2Y más expresado (P2Y<sub>1</sub>) y los receptores P2Y de menor expresión detectable (P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>12</sub>) (Fernández-Verdejo y cols., 2014), en músculo masetero estas diferencias son menores a 10 veces. Es decir, en músculo masetero, pese a que hay diferencias significativas en el nivel de expresión de los ARNm de los distintos subtipos de receptores P2Y, su abundancia relativa es mucho más homogénea. La comparación en el nivel de ARNm entre distintos subtipos de receptores P2Y es posible en nuestro trabajo, dado que hemos estandarizado la eficiencia de todos los partidores entre un 95-105%. Por tanto, todos amplifican de manera similar en las condiciones utilizadas.

En el caso de la expresión por inmunoblot o inmunofluorescencia, detectamos los mismos subtipos de receptores (P2Y<sub>1,2,6,12,14</sub>) en que se encontró ARNm, pero adicionalmente se detectó el receptor P2Y<sub>4</sub>. Mediante inmunoblot e inmunofluorescencia no es posible comparar el nivel de expresión de los distintos subtipos de receptores P2Y, dado que la detección se realiza con anticuerpos selectivos para cada proteína, que pueden tener características distintas de afinidad y estabilidad. El beneficio de estas técnicas es que nos permiten detectar la proteína y evaluar su localización a nivel tisular y celular. Todos los receptores P2Y expresados presentaron una distribución en la superficie (excepto el P2Y<sub>1</sub>), concordante con la marca de caveolina 3 en el sarcolema. Además, para la totalidad de receptores P2Y expresados se detectó un patrón punteado al interior de las fibras. Esto podría corresponder a receptor que está siguiendo la ruta

exocítica hacia la superficie, pero también es un patrón típico de distribución de proteínas en los túbulos T. Las proteínas que se distribuyen en estas invaginaciones de la membrana muscular presentan un patrón punteado en cortes transversales de músculo (Jeftinija y cols., 2007). Para corroborar este punto, queda pendiente la colocalización de la distribución de estos receptores con el DHPR (Cav 1.1), que es un marcador clásico de túbulos T, y la posterior evaluación por microscopía confocal para afinar la región de interés.

Cabe mencionar que en este trabajo no logramos estandarizar la detección del receptor P2Y<sub>4</sub> a nivel de ARNm. Se probaron tres parejas distintas de partidores para amplificar el receptor P2Y<sub>4</sub> por qPCR, y no se logró ni siquiera en el tejido usado como control positivo (cerebro). Las curvas de disociación nunca mostraron la amplificación de un producto único, sino que gran ruido y alta dispersión, por lo cual la estandarización de esta técnica a futuro es fundamental para poder determinar los niveles de ARNm y lograr una comparación con los otros subtipos de receptores P2Y.

Con respecto al efecto de diferentes estímulos en la expresión de los receptores purinérgicos, se ha evidenciado que en ratones sometidos a actividad física durante cinco semanas existe un aumento de los niveles de ARNm de P2Y<sub>14</sub> y una disminución de la expresión de ARNm de P2Y<sub>2</sub> en músculo FDB (Fernández-Verdejo y cols., 2014). Estos resultados sugieren que, bajo diferentes condiciones de trabajo muscular, se generan cambios en la expresión de ARNm de estos receptores. Considerando que la actividad muscular a nivel del aparato masticatorio es fundamental para el desarrollo craneofacial (Toro- Ibacache y cols., 2016), y que esta actividad puede variar como en casos de hiperactividad del músculo masetero en el bruxismo (Kato y cols., 2011), hipoactividad de este músculo en condiciones de dieta blanda por períodos prolongados, neuropatías, patologías como respiración bucal (Ikenaga y cols., 2013) o en tratamientos que implican la inyección de toxina botulínica en músculo masetero (Balanta y cols., 2018) sería interesante evaluar en estudios posteriores si bajo estas diferentes

condiciones de actividad masticatoria existen variaciones en la expresión de estos receptores.

Se conoce que en músculo FDB y miotubos el receptor P2Y<sub>2</sub> participa en la formación de un complejo multiproteico junto a DHPR y Panx1 (Arias y cols., 2016) relacionado con el AET descrito previamente. La presencia de este subtipo en músculo masetero de ratón, sugiere que este receptor podría estar formando parte de este complejo en este músculo. Su caracterización en estudios posteriores sería de gran utilidad para estudiar la vía del AET y su rol en la plasticidad de los músculos masticatorios.

En músculos de tronco y extremidades se ha descrito que tanto receptores P2Y como P2X pueden participar en eventos de desarrollo o reparación muscular luego de un daño (Ryten y cols., 2004; Chen y cols., 2011), en la regulación de la contracción muscular (Grishin y cols., 2006), o en el correcto establecimiento y mantención de la unión neuromuscular (Tsim y cols., 2002). Haber demostrado la expresión de receptores P2Y en músculo masetero abre el campo para estudiar su rol en fisiopatología. Actualmente se está realizando en nuestro laboratorio la caracterización de los receptores P2X expresados en músculo masetero, para ampliar el conocimiento de la señalización purinérgica en este sistema.

El presente trabajo empalma con la tesis en curso de Carolina Beato (tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad de Chile), que ha demostrado que el músculo masetero de ratón responde a ATP exógeno, cambiando la expresión de genes de plasticidad muscular o mioquinas (interleuquinas 1β y 6). Además, ha demostrado que el músculo masetero libera ATP cuando es estimulado eléctricamente, de manera frecuencia-dependiente, remedando el estímulo de la neurona motora. Esto sitúa al ATP como una posible molécula central de control autocrino/paracrino de la remodelación muscular en el sistema masticatorio.

Receptor	qPCR	Western Blot	Inmunofluorescencia
P2Y <sub>1</sub>	+	+	+
P2Y <sub>2</sub>	+	+	+
P2Y <sub>4</sub>	n.d	+	+
P2Y <sub>6</sub>	+	+	+
P2Y <sub>12</sub>	+	+	+
P2Y <sub>13</sub>	n.d	n.d	---
P2Y <sub>14</sub>	+	+	+

**Tabla 4. Resumen de la expresión de los distintos subtipos de receptores P2Y detectada en músculo masetero de ratón, según la técnica utilizada.**

+: Expresión detectada

n.d: Expresión no detectada

---: No analizado

## 12. CONCLUSIONES

A través del presente trabajo se pudo demostrar que el músculo masetero expresa receptores de tipo P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>12</sub> y P2Y<sub>14</sub>. La presencia de estos receptores en músculo masetero de ratón sugiere que las vías de señalización mediadas por ATP extracelular podrían estar presentes en músculos masticatorios. A partir del conocimiento de la presencia y ubicación de los receptores P2Y en músculo masetero de ratón, se podrá avanzar en la identificación del rol de estos receptores en la fisiología de los músculos masticatorios. Reconocer la relevancia de la señalización por ATP extracelular en fenómenos fisiológicos y/o patológicos que conlleven la remodelación muscular permitirá desarrollar opciones terapéuticas y moleculares para patologías del sistema músculo- esquelético en el aparato masticatorio. Esto eventualmente será un aporte al campo de la odontología, dado que actualmente las patologías del sistema masticatorio y témporomandibulares tienen un origen poco claro y complejo, siendo el tratamiento exclusivamente paliativo.

### 13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbracchio, M., Burnstock, G., Boeynaems, J., Barnard, E., Boyer J., Kennedy, C., et al.(2006). International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G Protein-Coupled Nucleotide Receptors: From Molecular Mechanisms and Pathophysiology to Therapy. *Pharmacological Reviews*, 58(3), 281-341.

Arias, M., Almarza, G., Díaz, A., Contreras, A., Valladares, D., Casas, M., Toledo, H., Jaimovich, E., Buvinic, S. (2016). Characterization of a multiprotein complex involved in excitation-transcription coupling of skeletal muscle. *Skeletal Muscle*, 6(1).

Balanta, J., Toro, V., Torres, M. A., Kupczik, K., Vega, C., Morales, C., Buvinic, S., et al. (2018). Early molecular response and microanatomical changes in the masseter muscle and mandibular head after botulinum toxin intervention in adult mice. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 216, 112–119.

Blaauw, B., Schiaffino, S., Reggiani, C. (2013). Mechanisms Modulating Skeletal Muscle Phenotype, *Comprehensive Physiology*, 3(4),1645-1687.

Baverstock, H., Jeffery, N., Cobb, S. (2013). The morphology of the mouse masticatory musculature. *Journal of Anatomy*, 223(1), 46–60.

Burnstock, G. (2006). Purinergic P2 receptors as targets for novel analgesics. *Pharmacology & Therapeutics*, 110(3), 433-454.

Burnstock, G., Arnett, T., Orriss I. (2013). Purinergic signalling in the musculoskeletal system. *Purinergic Signalling*, 9(4), 541–572.

Bustamante, M., Fernández-Verdejo, R., Jaimovich, E., Buvinic, S. (2014). Electrical stimulation induces IL-6 in skeletal muscle through extracellular ATP by activating Ca<sup>2+</sup> signals and an IL-6 autocrine loop. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 306(8), 869–882.

Buvinic, S., Briones, R., Huidobro, J. (2002). P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>2</sub> receptors are coupled to the NO/cGMP pathway to vasodilate the rat arterial mesenteric bed. *British Journal of Pharmacology*, 136(6), 847–856.

Buvinic, S., Poblete, M., Donoso, M., Delpiano, A., Briones, R., Miranda, R., Huidobro, J. (2006). P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>2</sub> receptor distribution varies along the human placental vascular tree: role of nucleotides in vascular tone regulation: P2Y receptor distribution in the human placenta vascular tree. *The Journal of Physiology*, 573(2), 427–443.

Buvinic, S., Almarza, G., Bustamante, M., Casas, M., López, J., Riquelme, M., Jaimovich, E., et al. (2009). ATP Released by Electrical Stimuli Elicits Calcium Transients and Gene Expression in Skeletal Muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 284(50), 34490–34505.

Casas, M., Buvinic, S., Jaimovich, E. (2014). ATP Signaling in Skeletal Muscle: From Fiber Plasticity to Regulation of Metabolism. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 42(3), 110–116.

Cavuoti, S., Matarese, G., Isola, G., Abdolreza, J., Femiano, F., & Perillo, L. (2016). Combined orthodontic-surgical management of a transmigrated mandibular canine. *The Angle Orthodontist*, 86(4), 681–691.

Chen, D., Wang, W., Guo, W., Yu, Q., Burnstock, G., He, C., Zheng, H. et al. (2011). Expression of P2Y<sub>6</sub> receptors in the developing mouse skeletal muscle and after injury and repair: Expression of P2Y<sub>6</sub> receptors. *Journal of Anatomy*, 218(6), 643–651.

Chromiak J., Antonio J. (2008). Skeletal Muscle Plasticity. *Essentials of Sports Nutrition and Supplements*, 21-52.

Fernández-Verdejo, R., Casas, M., Galgani, J., Jaimovich, E., Buvinic, S. (2013). Exercise Sensitizes Skeletal Muscle to Extracellular ATP for IL-6 Expression in Mice. *International Journal of Sports Medicine*, 35(4), 273–279.

Fields, R., Burnstock, G. (2006). Purinergic signalling in neuron–glia interactions. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(6), 423–436.

Gachet, C. (2006). Regulation of platelet functions by P2 receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 46(1), 277-300.

Gaudy, J., Zouaoui, A., Bravetti, P., Charrier, J. and Guettaf, A. (2000). Functional organization of the human masseter muscle. *Surgical and Radiologic Anatomy*, 22(3-4), 181-190.

Grishin, S., Teplov, A., Galkin, A., Devyataev, A., Zefirov, A., Mukhamedyarov, M., Palotás, A. et al. (2006). Different effects of ATP on the contractile activity of mice diaphragmatic and skeletal muscles. *Neurochemistry International*, 49(8), 756–763.

Grunheid, T., Langenbach, G., Korfage, J., Zentner, A., Van Eijden, T. (2009). The adaptive response of jaw muscles to varying functional demands. *The European Journal of Orthodontics*, 31(6), 596–612.

Hayato, R., Ohtubo, Y., Yoshii, K. (2007). Functional expression of ionotropic purinergic receptors on mouse taste bud cells: ATP receptors of taste bud cells. *The Journal of Physiology*, 584(2), 473–488.

Ikenaga, N., Yamaguchi, K., Daimon, S. (2013). Effect of mouth breathing on masticatory muscle activity during chewing food. *Journal of Oral Rehabilitation*, 40(6), 429-435.

Isola, G., Anastasi, G., Matarese, G., Williams, R., Cutroneo, G., Bracco, P., Piacino, M. (2017). Functional and molecular outcomes of the human masticatory muscles. *Oral Diseases*.

Jeftinija, D., Wang, Q., Hebert, S., Norris, C., Yan, Z., Rich, M., Kraner, S. (2007). The Ca<sub>v</sub> 1.2 Ca<sup>2+</sup> channel is expressed in sarcolemma of type I and IIa myofibers of adult skeletal muscle. *Muscle & Nerve*, 36(4), 482–490.

Jorquera, G., Altamirano, F., Contreras, A., Almarza, G., Buvinic, S., Jacquemond, V., Jaimovich, E., Casas, M. (2013). Cav1.1 controls frequency-dependent events regulating adult skeletal muscle plasticity. *Journal of Cell Science*, 126(5), 1189–1198.

Kato T., Masuda Y., Yoshida A., Morimoto T. (2011). Masseter EMG activity during sleep and sleep bruxism. *Archives Italiennes de Biologie*, 149, 478-491.

Korfage, J., Koolstra, J., Langenbach, G., Van Eijden, T. (2005). Fiber-type Composition of the Human Jaw Muscles-(Part 1) Origin and Functional Significance of Fiber-type Diversity. *Journal of Dental Research*, 84(9), 774–783

Kwa, S., Weijs, W., Juch, P. (1995). Contraction characteristics and myosin heavy chain composition of rabbit masseter motor units. *Journal of Neurophysiology*,

73(2), 538-549.

Lazarowski, E., Boucher R. Harden T. (2003). Mechanisms of Release of Nucleotides and Integration of Their Action as P2X- and P2Y-Receptor Activating Molecules. *Molecular Pharmacology*, 64(4), 785-795.

Langenbach, G., Van de Pavert, S., Savalle, W., Korfage, H., Van Eijden, T. (2003). Influence of food consistency on the rabbit masseter muscle fibres. *European Journal of Oral Sciences*, 111(1), 81–84.

Latarjet, M., Ruiz, A., Dvorkin, M., Pró, E. (2013). Anatomía Humana. (Cuarta edición). Editorial Médica Panamericana.

Lewis, M., N Shah., R. (2013). Masticatory Muscle Structure and Function, in Craniofacial Muscles. A New Framework for Understanding the Effector Side of Craniofacial Muscle Control. *Craniofacial Muscles* Springer, Editor. New York, Unated States, 91-139.

Lim, J., Mitchell, C. (2012). Inflammation, Pain, and Pressure—Purinergic Signaling in Oral Tissues. *Journal of Dental Research*, 91(12), 1103–1109.

Ling, K., Siow, N., Choi, R., Ting, A., Kong, L., Tsim, K. (2004). ATP Potentiates Agrin-induced AChR Aggregation in Cultured Myotubes: Activation of roha in P2Y<sub>1</sub> nucleotide receptor signaling at vertebrate neuromuscular junctions. *Journal of Biological Chemistry*, 279(30), 31081–31088.

Manns A., Biotti J. (2013). Manual de Oclusión Dentaria. (Segunda edición). Editorial Amolca.

Matarese, G., Isola, G., Alibrandi, A., Lo Gullo, A., Bagnato, G., Cordasco, G., Perillo, L. (2016). Occlusal and MRI characterizations in systemic sclerosis patients: A prospective study from Southern Italian cohort. *Joint Bone Spine*, 83(1), 57–62.

May, C., Weigl, L., Karel, A., Hohenegger, M. (2006). Extracellular ATP activates ERK1/ERK2 via a metabotropic P2Y<sub>1</sub> receptor in a Ca<sup>2+</sup> independent manner in differentiated human skeletal muscle cells. *Biochemical Pharmacology*, 71(10), 1497–1509.

North, R. (2002). Molecular Physiology of P2X Receptors. *Physiological Reviews*, 82(4), 1013–1067.

Okeson, J. (2013). Tratamiento de oclusión y afecciones temporomandibulares. (Séptima edición). London: Elsevier Health Sciences Spain.

Orriss, I., Burnstock, G., Arnett, T. (2010). Purinergic signalling and bone remodelling. *Current Opinion in Pharmacology*, 10(3), 322–330.

Pette, D., Sketelj, J., Skorjanc, D., Leisner, E., Traub, I., Bajrović, F. (2002). Partial fast-to-slow conversion of regenerating rat fast-twitch muscle by chronic low-frequency stimulation. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 23(3), 215–221.

Pfaffl, M. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), 45.

Rouvière, H; Delmas A. *Anatomía humana: descriptiva, topográfica y funcional* (Undécima edición). Editorial Masson.

Ryten, M., Yang, S. Y., Dunn, P. M., Goldspink, G., Burnstock, G. (2004). Purinoceptor expression in regenerating skeletal muscle in the *mdx* mouse model of muscular dystrophy and in satellite cell cultures. *The FASEB Journal*, 18(12), 1404–1406.

Satrawaha, S., Wongkhantee, S., Pavasant, P. and Sumrejkanchanakij, P. (2011). Pressure induces interleukin-6 expression via the P2Y<sub>6</sub> receptor in human dental pulp cells. *Archives of Oral Biology*, 56(11), 1230-1237.

Schwiebert, E., Zsembery, A. (2003). Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1615(1–2), 7–32.

Schiaffino, S. and Reggiani, C. (2011). Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles. *Physiological Reviews*, 91(4), 1447-1531.

Smerdu, V., Karsch, I., Campione, M., Leinwand, L., Schiaffino, S. (1994). Type IIx myosin heavy chain transcripts are expressed in type IIb fibers of human skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 267(6), 1723–1728.

Stienen, G., Kiers, J., Bottinelli, R. and Reggiani, C. (1996). Myofibrillar ATPase activity in skinned human skeletal muscle fibres: fibre type and temperature dependence. *The Journal of Physiology*, 493(2), 299-307.

Toniolo, L., Cancellara, P., Maccatrozzo, L., Patrino, M., Mascarello, F., Reggiani, C. (2008). Masticatory myosin unveiled: first determination of contractile parameters of muscle fibers from carnivore jaw muscles. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 295(6), 1535-1542.

Toro, V., Zapata, V., O'Higgins, P. (2016). The relationship between skull morphology, masticatory muscle force and cranial skeletal deformation during biting. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 203, 59–68.

Tsim, K., Barnard, E. (2002). The Signaling Pathways Mediated by P2Y Nucleotide Receptors in the Formation and Maintenance of the Skeletal Neuromuscular Junction. *Neurosignals*, 11(1), 58–64.

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), 75340.

Von Kügelgen, I., Hoffmann, K. (2016). Pharmacology and Structure of P2Y receptors. *Neuropharmacology*, 104, 50–61

Weiss, A., Leinwand, L. (1996). The mammalian myosin heavy chain gene family. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 12, 417–439.

Zimmermann, H., Zebisch, M., Sträter, N. (2012). Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signalling*, 8(3), 437-502.

## 14. ANEXOS

### Anexo 1. Certificado de Bioética



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

## Anexo 2. Certificado de Bioseguridad



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

Santiago, 26 de Mayo de 2015.

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

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

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

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

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

**Dr. Mario Chiong**  
Secretario



**Dra. Carla Lozano M.**  
Presidenta

Facultad de Odontología. Sergio Livingstone P. 943, Independencia, Fono 29781792-29781832, Fax: 29781748, Santiago.  
<http://odontologia.uchile.cl>  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Sergio Livingstone P. 1007, Independencia, Fono 29781792 Fax: 29781748,  
Santiago. <http://www.quimica.uchile.cl/>