



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DOCTORAL EN BIOQUÍMICA

**Regulación de la expresión de proteínas morfogenéticas óseas
por el trifosfato de adenosina en osteoblastos de rata pre y post
infección con virus de Sarampión y Junín:**

Rol de receptores P2 y mecanismos de señalización

Bqca. Victoria Belén Ayala Peña

Bahía Blanca

Argentina

2013



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DOCTORAL EN BIOQUÍMICA

Regulación de la expresión de proteínas morfogenéticas óseas
por el trifosfato de adenosina en osteoblastos de rata pre y post
infección con virus de Sarampión y Junín:
Rol de receptores P2 y mecanismos de señalización

Bqca. Victoria Belén Ayala Peña

Bahía Blanca

Argentina

2013

Prefacio

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctora en Bioquímica, de la Universidad Nacional del Sur (UNS) y los resultados que en ella se presentan no han sido utilizados previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. Dichos resultados han sido obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Química Biológica-A/ Virología Clínica, dependiente del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur, y en el Laboratorio de Virología, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, durante el período comprendido entre Noviembre del 2011 y el 8 de Noviembre del 2013, bajo la dirección de la Dra. Graciela E. Santillán, Profesora de Química Biológica-A del Depto. de Biología Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur, e Investigador Independiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, y el Dr. Luis A. Scolaro, Profesor de Virología del Depto. de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, e Investigador Independiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

Victoria Belén Ayala Peña



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Postgrado y Educación Continua

La presente Tesis ha sido aprobada el/...../....., mereciendo
la clasificación de (.....)

Dedicatoria

*A mi gran Amor, mi esposo Sergio Manglus
a quien amo con todo mi corazón.
Gracias por recorrer este camino conmigo,
y hacerme tan feliz con la familia que hemos formado.*

Agradecimientos

Primero y antes que nada, quiero dar gracias a Dios, por estar conmigo en cada paso que doy y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo mi periodo de formación doctoral. Quiero agradecer a mis directores, la Dra. Graciela E. Santillán, por ofrecerme la maravillosa oportunidad de trabajar en su laboratorio, por estar siempre presente y dispuesta para guiarme en el desarrollo de mi trabajo experimental, por su compromiso en este proyecto, por transmitirme su sabiduría y por sus consejos, y el Dr. Luis A. Scolaro, por permitirme tener el privilegio de trabajar bajo su dirección, por la confianza que depositó en mi desde un principio, la libertad que me brindó para manejarme durante la realización de este trabajo de Tesis y por estar ahí cada vez que lo necesité. A ambos por la enorme paciencia que me tuvieron todo este tiempo.

Al Dr. Ricardo Boland del Laboratorio de Química Biológica de la Universidad Nacional del Sur, por haberme brindado un lugar en su laboratorio en el cual conocí a Graciela, y a la Dra. Elsa Damonte del Laboratorio de Virología de la Universidad de Buenos Aires, por haberme brindado un lugar en su laboratorio en el cual conocí a Luis. A ambos por haberme permitido desarrollar parte de mi Tesis doctoral en sus instalaciones.

A la Universidad Nacional del Sur y CONICET por brindarme los medios para realizar esta Tesis de doctorado.

A la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Sur por becarme para realizar mis primeras pasantías en la Universidad de Buenos Aires.

A todos mis compañeros de trabajo de ayer y de hoy:

A Euge, una gran amiga y excelente persona, que es sin duda una de las más importantes por la amistad que nació junto con esta Tesis, gracias por el cuartito!, por tu buena onda, el Baby Shower y demás!.

A Andy por recibirme en su casa en mis primeras pasantías en Buenos Aires. Gracias por tu calidez!

A Flor y Peter, por su contención personal y laboral, por sus palabras de aliento y su constante apoyo.

A Nico y la Dra. Mónica, por compartir sus experiencias en el laboratorio, por su disposición para compartir protocolos de trabajo y reactivos.

A los demás chicos del Laboratorio de Virología de la UBA: Belén, Juli, Lu, Ana Clara, Maru y Jose con los cuales compartí seminarios, almuerzos, horas de trabajo, congresos y jornadas. Gracias por tantos agradables momentos.

A las chicas del Laboratorio de Química Biológica de la UNS: Naty y Juli, y a las chicas del Laboratorio de Neurobiología del INIBIBB: Connie, Sofi y Vir. Que compartieron muchos años conmigo y el inicio de mi formación en investigación.

A todos ellos gracias por la buena onda de todos los días, que hizo que venir a trabajar no se vuelva una rutina. Gracias a todos por tantos años de paciencia y compañerismo. Por tantos momentos divertidos, tantos congresos y salidas compartidas!!

A mis compañeras de la cátedra de Virología Clínica, Lore y Gaby, por los mates y tortas, los buenos momentos de risas y abrazos, por sus orejas y tan sabios consejos.

A mis amigos de toda la vida, por acompañarme y apoyarme incondicionalmente en los buenos y malos momentos.

Muchas gracias a mis padres, hermanos, hermanas y suegros por todo el apoyo brindado a través de todos estos años, por el interés que siempre demostraron durante cada etapa de realización de este trabajo de Tesis, y por estar siempre a mi lado. Especialmente a mis padres Ricardo y Vivian por infundirme el espíritu de superación y trabajo y recordarme día a día qué es lo realmente importante en la vida. Este es el fruto de sus consejos.

Al amor de mi vida, mi compañero incondicional, mi esposo, por su paciencia en esta etapa de mi vida, las interminables esperas al regreso de mis pasantías y congresos, su contención y protección en todo momento, y fundamentalmente por darme este regalo tan bello, el fruto que llevo dentro mío, nuestro primer hijo. Te Amo!.

Y a todas aquellas personas que comparten conmigo este triunfo.

Resumen

El conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la modulación de las funciones biológicas de los osteoblastos, células responsables de la formación de hueso, es indispensable como punto de partida para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas aplicables en las patologías óseas. La acción del trifosfato de adenosina (ATP) sobre los receptores purinérgicos de la membrana plasmática ha mostrado regular importantes funciones celulares de los osteoblastos.

Los resultados expuestos en esta Tesis describen por primera vez, el efecto del ATP sobre la expresión de proteínas inductoras de formación de hueso en osteoblastos de calvaria de rata (OBCs), como así también la modulación de dicho suceso por la infección con los virus de Sarampión (MEV) y Junín (JUNV). Mediante diferentes técnicas, como ensayos de proliferación, determinación de deposiciones de calcio, citometría de flujo y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, se demostró que la activación por ATP de los receptores P2Y₂ estimula la proliferación y diferenciación de los OBCs. Además, se observó que estos receptores modulan positivamente la expresión de proteínas asociadas a la diferenciación osteoblástica como las proteínas morfogenéticas óseas (BMP-2, 4, 5 y 7), sialo-proteína ósea, colágeno y fosfatasa alcalina. Se demostró la participación de la vía de la fosfatidil inositol 3 quinasa / proteína quinasa B (PI3K/AKT) en la estimulación inducida por el ATP sobre la proliferación y diferenciación de los OBCs. También, el empleo de diferentes nucleótidos sugiere que la expresión génica de BMP-1, 3, y 6 estaría regulada por los subtipos P2Y₆, P2Y_{4,1,12,13} y P2Y_{6,1,12,13} respectivamente. Además, por técnicas de microscopía convencional y de fluorescencia, western blot y ensayos de infectividad, se demostró que MEV o JUNV pueden infectar a los OBCs y modular la expresión de varias proteínas relacionadas con la diferenciación de los osteoblastos. La infección con MEV mostró analogía con datos reportados en la literatura, de biopsias de pacientes con otosclerosis, enfermedad de los huesecillos del oído que causa sordera. Sin embargo, a diferencia de lo observado para el tratamiento con ATP, esta modulación no ocurre a través de la vía PI3K/AKT. La activación de los receptores P2Y_{1, 12, 13} inhibe la multiplicación o liberación de MEV. En cambio en el caso de los OBCs

infectados con JUNV, los tratamientos con nucleótidos no modificaron los títulos virales, sin embargo, generaron péptidos truncados derivados de la nucleoproteína viral característicos de la infección persistente de cultivos celulares por JUNV. Asimismo, se comprobó la capacidad de JUNV de infectar persistentemente a los OBCs. Estos resultados permiten especular acerca de las probables alteraciones inducidas por el virus en la respuesta de los OBCs a estímulos externos y ubica a estos sistemas virus-célula como modelos de estudio de enfermedades óseas de probable etiología viral como la otosclerosis.

Los resultados aquí presentados contribuyen a la comprensión de los mecanismos involucrados en la modulación de la proliferación y maduración de osteoblastos por receptores purinérgicos y también como respuesta a la infección viral.

Abstract

The knowledge of molecular mechanisms involved in the modulation of osteoblasts biological functions, cells responsible for bone formation, is essential as a starting point to design new therapeutic strategies applicable in bone diseases. The adenosine triphosphate (ATP) action on purinergic receptors of plasma membrane has shown to regulate important cellular functions in osteoblasts.

The results presented in this thesis describe, for the first time, the ATP effect on the expression of proteins related to bone formation in rat calvarial osteoblasts (OBCs), as well as the modulation of this event when infected with Measles (MEV) and Junin (JUNV) virus. Using different techniques, such as proliferation trials, calcium deposition determination, flow cytometry and real-time quantitative polymerase chain reaction, it was demonstrated that the P2Y₂ receptor activation by ATP, stimulates OBCs proliferation as well as differentiation. Moreover, it was observed that these receptors positively modulate those proteins associated with osteoblast differentiation such as bone morphogenetic proteins (BMP-2, 4, 5 and 7), bone sialoprotein, collagen and alkaline phosphatase. It has been demonstrated that the phosphatidylinositol 3 kinase / protein kinase B (PI3K/AKT) pathway is involved in the proliferation and differentiation of OBCs. The use of different nucleotides also suggests that BMP-1, 3, and 6 gene expression would be regulated by P2Y₆, P2Y_{4, 1, 12, 13} and P2Y_{6, 1, 12 and 13} subtypes receptors respectively. In addition, by conventional microscopy and fluorescence techniques, western blot and infectivity assays, it was demonstrated that both viruses are able to infect OBCs and modulate several proteins related to these cells differentiation. These results are in accordance with reports dealing with biopsies from patients suffering otosclerosis, a human disease of the ear ossicles which causes hearing impairment. However, by contrast to that observed for the treatment with ATP, viral modulation does not occur via PI3K/AKT. The P2Y_{1, 12, 13} receptors activation inhibit the MEV release or multiplicity; however in the case of OBCs infected with JUNV, the treatments with different nucleotides did not modify the viral titer but it induced the appearance of truncated peptides derived from the viral nucleoprotein, a salient feature of persistent infection of JUNV *in vitro*. In

addition and accordance to the results shown here, JUNV was able to infect OBCs, persistently. On the other hand, results allow speculation about the viral modulation of OBCs response to external stimuli and the perspectives of virus-cell systems as useful models in the study of otosclerosis, a bone disease associated to viral infection.

The results presented here contribute to understand the mechanisms involved in the modulation of proliferation and maturation in osteoblasts by purinergic receptors as well as in response to viral infection.

Certifico que fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridas por los jurados.

Firma del Director

	Pág
Abreviaturas	5
Introducción	8
El hueso	9
Células óseas	10
Matriz orgánica	11
Reparación y remodelado óseo	16
Diferenciación osteoblástica	17
El ATP extracelular como modulador de la formación de hueso	19
Nucleótidos de purina y de pirimidina	19
Mecanismos de liberación y transporte de ATP en el microambiente óseo	21
Receptores Purinérgicos	21
Interacción entre nucleótidos y receptores P2	22
Mecanismos de señalización de receptores P2Y	23
Señalización por receptores P2 en osteoblastos	24
Otosclerosis	27
Prevalencia de la Otosclerosis	27
Diagnóstico	29
Tratamiento	29
Etiopatogenia de la Otosclerosis	30
Otosclerosis y Paget	31
Los virus	32
La familia <i>Paramyxoviridae</i>	33
Virión del Sarampión	34
Clínica y epidemiología	36
Tratamiento, prevención y situación epidemiológica en Argentina	37
La familia <i>Arenaviridae</i>	40
Virión de Junín	41
Ciclo de replicación	42
Clínica y epidemiología	42
Prevención y tratamiento de la FHA	44
BMPs vs infección viral	46

AKT vs infección viral	47
Hipótesis de trabajo	47
Objetivos	48
Metodología	50
Drogas y reactivos	51
Obtención de osteoblastos calvariales (OBCs) de rata	51
Tratamiento celular	53
Virus	53
Infección de los OBCs	54
Inmunocitoquímica y microscopía de fluorescencia convencional	54
Western blot	55
Ensayo de proliferación celular	56
Determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina (FAL)	56
Valoración de la mineralización ósea	57
Cuantificación de proteínas	58
Estudio de ciclo celular por citometría de flujo	58
Obtención del ADNc	59
PCR cuantitativa en tiempo real (QRT-PCR)	59
Análisis estadístico	61
Resultados y discusión	62
I- Optimización de siembra y condiciones de cultivo de osteoblastos de calvaria de rata	63
I-1- Densidad de siembra	63
I-2- Privación de suero	64
I-3- Arresto del ciclo celular bajo privación de suero	65
II- Rol del ATP y UTP sobre la proliferación de los OBCs	67
II-1- Tratamiento con ATP	67
II-2- Tratamiento con UTP	68
III- Rol de la vía PI3K/AKT en la estimulación de la proliferación de los OBCs por el ATP y UTP	70
IV- Efecto del ATP sobre el ciclo celular de los OBCs	71
V- Efecto de la estimulación purinérgica sobre la diferenciación celular	77

V-1- Modulación de la actividad de FAL por ATP	77
V-2- Modulación de la actividad de FAL por UTP	78
V-3- Modulación de la actividad de FAL por ADP	79
V-4- Modulación de la actividad de FAL por UDP	80
V-5- Modulación de la actividad FAL por ATP γ S y UTP 100 μ M	81
VI- Rol de la vía PI3K/AKT en la diferenciación de los OBCs	83
VII- Efecto de la estimulación purinérgica sobre la formación de nódulos de mineralización ósea y morfología celular	85
VII-1- Formación de nódulos de mineralización ósea	85
VII-2- Cambios morfológicos	86
VIII- Determinación de diversas proteínas indicadoras de diferenciación osteoblástica por QRT-PCR	90
VIII-1- Efecto de la estimulación purinérgica sobre la expresión de FAL	90
VIII-2- Efecto de la estimulación purinérgica sobre la expresión de BSP	91
VIII-3- Efecto de la estimulación purinérgica sobre la expresión de Col1 α 1	92
VIII-4- Efecto de la estimulación purinérgica sobre la expresión de OPG	94
IX- Determinación de los niveles de expresión de diversas BMPs por QRT-PCR	97
IX-1- Efecto de la estimulación purinérgica sobre la expresión de BMP-4	97
IX-2- Efecto de la estimulación purinérgica sobre la expresión de BMP-1	99
IX-3- Efecto de la estimulación purinérgica sobre la expresión de BMP-2	99
IX-4- Efecto de la estimulación purinérgica sobre la expresión de BMP-3	101
IX-5- Efecto de la estimulación purinérgica sobre la expresión de BMP-5	101
IX-6- Efecto de la estimulación purinérgica sobre la expresión de BMP-6	102
IX-7- Efecto de la estimulación purinérgica sobre la expresión de BMP-7	103
X- Determinación del efecto de la inhibición de la vía PI3K/AKT sobre los niveles de expresión génica de FAL y BMP-4 por QRT-PCR	105
XI- Infección de los OBCs con MEV	108
XI-1- Multiplicación de MEV en los OBCs	108
XI-2- Modulación génica de proteínas responsables de la diferenciación en los OBCs infectados con MEV	113
XI-3- Modulación de la respuesta celular en osteoblastos infectados con MEV en presencia de estímulos purinérgicos	118
XI-3-a- Efecto de la estimulación purinérgica sobre el rendimiento	118

viral en los OBCs infectados con MEV	
XI-3-b- Modulación génica de las BMPs, en los OBCs infectados con MEV	120
XI-3-c- Determinación de diversas proteínas indicadoras de diferenciación osteoblástica por QRT-PCR	125
XI-4- Rol de la vía PI3K/AKT sobre la respuesta celular en los OBCs infectados con MEV en presencia de estímulos purinérgicos	128
XII- Infección de los OBCs con JUNV	131
XII-1- Caracterización de los OBCs infectados con JUNV	131
XII-2- Análisis de la expresión de la proteína N de JUNV en los OBCs	133
XII-3- Infección persistente de JUNV en los OBCs	134
XII-4- Respuesta de los OBCs infectados con JUNV frente a los tratamientos con agonistas purinérgicos	134
XII-5- Estudio de la BMP-4, BMP-6, BSP, y FAL en los OBCs infectados con JUNV	136
Conclusiones	140
Publicaciones realizadas durante la formación doctoral	144
Bibliografía	146

Abreviaturas

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

ADP: adenosín difosfato

ADP β S: adenosín beta-tio difosfato (análogo no hidrolizable del ADP)

AKT: proteína quinasa B

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

AMP: adenosín monofosfato o monofosfato de adenosina

AMPc: monofosfato de adenosina cíclico

ATP: adenosin trifosfato o trifosfato de adenosina

ATP γ S: adenosín gama-tio trifosfato (análogo no hidrolizable del ATP)

BMP: proteína morfogénica ósea

BSP: sialo-proteína ósea

Col: colágeno

DE: desvío estándar

DMEM: medio Eagle modificado de Dulbecco

DO: densidad óptica

ECP: efecto citopático

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

FAL: fosfatasa alcalina ósea

FHA: Fiebre hemorrágica argentina

GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa

hs: horas

IGF: factor de crecimiento insulínico

IgG: inmunoglobulina G

JUNV: virus de Junín

kDa: kiloDaltons

m.o.i.: multiplicidad de infección

MEM: medio mínimo esencial

MEV: virus de Sarampión

min: minutos

MTS: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium

OBCs: osteoblastos de calvaria de rata

OC: osteocalcina

OP: osteopontina

OPG: osteoprotegerina

p.i.: post infección

PI3K: fosfatidilinositol 3 quinasa

PBS: buffer fosfato salino

QRT-PCR: PCR cuantitativa en tiempo real

RANKL: ligando del receptor para la activación del factor nuclear K- β

RIB: ribavirina

RSV: virus Sincicial Respiratorio

seg: segundos

SFB: suero fetal bovino

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta

u.a.: unidades arbitrarias

UDP: uridin difosfato o difosfato de uridina

UFP: unidades formadoras de placa

UI/L: unidades internacionales por litro

UTP: uridin trifosfato o trifosfato de uridina

VIH: virus de la Inmunodeficiencia Humana Adquirida

vs: versus

WB: Western Blot

Introducción

El hueso

El hueso se considera un tejido conectivo especializado y está formado por tres componentes (Gehron-Robey, 1996):

- Células óseas: En el tejido óseo maduro y en desarrollo, se pueden diferenciar cuatro tipos de células; osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Los tres primeros tipos son estadios funcionales de un único tipo celular.
- Matriz mineral: es el componente mayoritario, constituye el 65% de la masa ósea. Los minerales que la integran son principalmente calcio y fosfato en forma de cristales de hidroxiapatita.
- Matriz orgánica u osteoide: junto con las células constituye el 35% de la masa ósea, está constituida principalmente por colágeno tipo I.

El hueso externa e internamente está recubierto por membranas: periostio y endostio.

- El periostio es el tejido conectivo denso que recubre al hueso, excepto en las áreas tapizadas por cartílago articular. La capa externa fibrosa del periostio consiste en tejido conectivo denso irregular. La capa interna contiene células osteoprogenitoras capaces de diferenciarse en osteoblastos o condroblastos. Las terminaciones nerviosas del periostio son las responsables de la mayor parte del dolor provocado por los traumatismos óseos.
- El endostio reviste todas las superficies internas, incluyendo los espacios medulares y conductos vasculares. Se conforma de tejido conectivo laxo y muy fino. El endostio, que también contiene células osteoprogenitoras, se continúa con la capa interna del periostio en los orificios de desembocadura de los conductos vasculares que perforan al hueso y principalmente está formado por células osteogénicas planas.

Células óseas

Células osteoprogenitoras u osteogénicas: Proviene del mesénquima en el embrión. Poseen forma de huso. En el adulto, se encuentran en la capa celular interna del periostio y del endostio. Su diferenciación hacia osteoblastos depende de las condiciones del medio.

Osteoblastos: son las células responsables de la formación de hueso, sintetizan la mayor parte de la matriz orgánica que luego se calcifica a través de un proceso bien regulado denominado mineralización ósea. Son células mononucleares que surgen por diferenciación de las células osteoprogenitoras mesenquimales, bajo la influencia de la familia de proteínas morfogénicas óseas (BMPs), del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), y factores de transcripción como el Runx-2 (Costessi y col., 2005). Sintetizan colágeno tipo I y otras proteínas no colágenas como RANKL (ligando del receptor para la activación del factor nuclear K- β), Osteonectina (ON), Osteoprotegerina (OPG), Osteopontina (OP), Osteocalcina (OC), Sialo-proteína ósea (BSP), Fosfatasa Alcalina (FAL), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y BMPs entre otras. Poseen receptores de hormonas, vitaminas y citocinas. Cuando quedan envueltos por la matriz ósea, adoptan un estado de reposo y se transforman en osteocitos. Al entrar en un estado de inactividad se les llama células de recubrimiento óseo.

Osteocitos: son osteoblastos completamente diferenciados, que se encuentran en estado de reposo inmersos en una laguna de mineral óseo. Se adaptan a la forma de la laguna y emiten prolongaciones digitiformes largas que se extienden por canalículos de la matriz ósea, contactándose con otros osteocitos. En esas zonas de contacto las membranas forman unnexo que permite el intercambio de iones, moléculas pequeñas y hormonas. Presentan características similares a los osteoblastos, pero son menos activos y por lo tanto su retículo endoplasmático y aparato de Golgi están menos desarrollados. Se encargan de sintetizar los componentes necesarios para el mantenimiento de la matriz que los rodea. Están ampliamente relacionados con la mecanotransducción. La acción muscular transmite al hueso una tensión que es detectada por la red de osteocitos incluida en el interior del hueso. Éstos

reaccionan a la tensión ejercida liberando AMPc, OC, somatomedinas, prostaglandinas, óxido nítrico e IGF-I, que estimulan tanto su actividad como la de los osteoblastos y originan una mayor formación ósea. Por el contrario, la falta de actividad muscular, el reposo o la ingravidez tienen un efecto deletéreo sobre el hueso, acelerando la reabsorción (Morey y col., 1978). Se discute si se pueden transformar, por desdiferenciación, en osteoblastos activos.

Osteoclastos: se encargan de destruir o resorber hueso. Son células multinucleadas secretoras de enzimas y proteasas que disuelven la matriz mineralizada, rompen la matriz orgánica y tienen un origen hematopoyético compartido con el linaje mononuclear-fagocítico. Pueden llegar a ser células gigantes (hasta 150 μm de diámetro), con varios núcleos.

Matriz orgánica

La matriz ósea extracelular constituye una importante reserva de factores de crecimiento, especialmente los sintetizados por las células óseas como TGF- β , IGF (factor de crecimiento insulínico), FGF (factor de crecimiento de fibroblastos) y PDGF (factor de crecimiento de plaquetas). Los factores de crecimiento regulan el desarrollo celular y determinan la calcificación de la matriz ósea. TGF- β cumple un rol importante en los procesos de formación y mineralización de la matriz ósea.

El 90% de la matriz orgánica u osteoide es colágeno tipo I (Gehron-Robey, 1996) y el resto está compuesto por sustancia fundamental. La sustancia fundamental está compuesta por glucosaminoglucanos como el condroitín-sulfato, queratán-sulfato y ácido hialurónico. También contiene proteoglucanos de pequeño tamaño y otras proteínas, no colágenas, dependientes de la vitamina D y exclusivas del hueso como OC, OP, BSP, y ON.

Colágeno tipo I: Se presenta en fibrillas estriadas de 20 a 100 nm de diámetro, agrupándose para formar fibras colágenas mayores. Sus subunidades mayores están constituidas por cadenas alfa de dos tipos (alfa1 y alfa2), que difieren ligeramente en su composición de aminoácidos y en su secuencia. Es sintetizado por fibroblastos, condroblastos y osteoblastos. Su

función principal es la de resistencia al estiramiento. Sobre las fibras de colágeno maduro comienza el proceso de calcificación correspondiente a la incorporación de cristales de hidroxapatita.

ON: péptido sintetizado por los osteoblastos. Es una de las proteínas no-colágena más abundante en el hueso. Regula la homeostasis del calcio. Se ha visto que su expresión se encuentra elevada en células mesenquimales luego de su diferenciación hacia osteoblastos (Barhanpurkar y col., 2012). Aún se discute acerca de los estadios de diferenciación en los que se expresa la ON.

BSP: es un componente importante de la matriz mineralizada del hueso, dentina, cemento y cartílago calcificado. La BSP es la fosfoproteína de la matriz extracelular del hueso que constituye el 8% aproximadamente de todas las proteínas no colágenas de hueso y cemento radicular. Esta proteína presenta en su estructura un alto contenido de ácido siálico el cual le da un pKa de ~ 3.9, así mismo contiene una gran cantidad de residuos de ácido glutámico (~22%). Estas características dividen a la BSP en dominios específicos cuyas funciones son la unión a la fibra de colágeno, nuclear los cristales de hidroxapatita y permitir la unión a integrinas cerca del carboxilo terminal. Esta proteína juega un papel importante en la biomineralización de la matriz extracelular regulando la maduración de los cristales de hidroxapatita y su deposición (Ganss y col., 1999; Giachelli y Steitz., 2000; Gordon y col., 2007). Además, cumple una función esencial durante los movimientos óseos, los cuales causan tensión generando respuestas celulares y moleculares que pueden afectar la matriz extracelular (Kreke y col., 2005; Park y col., 2012).

OP: junto con la OC es uno de los componentes no-colágeno que se encuentra en mayor proporción en la matriz extracelular. Es secretada por osteoblastos y se encuentra involucrada en proliferación, apoptosis, e inflamación, además ha sido implicada en procesos de remodelación ósea asociados a estrés mecánico (Denhardt y col., 2001).

OC: es secretada por osteoblastos. A pesar de ser la OC una proteína muy estudiada, particularmente en mamíferos, la función exacta todavía se discute. Estudios en ratas con supresión de la expresión de OC han mostrado una acelerada mineralización ósea respecto a los controles (Ducy y col., 1996).

Otros estudios han revelado un posible rol sobre la maduración ósea (Boskey y col., 1998), y sobre la maduración de osteoclastos (Ishida y Amano, 2004).

Fosfatasa Alcalina Ósea (FAL): es una enzima liberada desde la membrana del osteoblasto y sus precursores cuando el proceso de desarrollo de la matriz ósea es activo. Se ha sugerido que la FAL estimula la mineralización ósea al liberar fosfato inorgánico, que contribuye al precipitado de complejos calcio-fósforo en la matriz osteoide (Harris, 1989). Parte de la FAL pasa a la sangre, por lo cual la concentración sanguínea de esta enzima es uno de los indicadores clínicos de la formación de hueso.

RANKL: es una proteína soluble liberada por los osteoblastos. Se une al receptor-activador del factor nuclear NF- κ B (RANK) presente en la membrana del preosteoclasto. La activación de RANK por RANKL favorece la diferenciación y activación de osteoclastos, también aumenta su supervivencia e inhibe su apoptosis.

OPG: es un receptor trampa (señuelo) que se une al RANKL. Es una proteína liberada por los osteoblastos en forma soluble para proteger al esqueleto de una excesiva resorción ósea. Su unión a RANKL impide la interacción con RANK inhibiendo la diferenciación y activación del precursor osteoclástico y favoreciendo su apoptosis (Fig. 1). Se ha encontrado una relación RANKL/OPG elevada (indicativa de osteoclastogénesis) en una serie de enfermedades con remodelado óseo desequilibrado (McCormic, 2007; Boyce y col., 2007).

BMPs: Las BMPs, llevan su nombre debido a que originalmente fueron descubiertas por su capacidad de inducir la formación ectópica de hueso *in vivo* (Urist, 1965). Son citocinas provenientes de la familia del TGF- β , muy importantes en la embriogénesis, crecimiento postnatal, remodelado y regeneración del esqueleto (Senta y col., 2009). Hasta el presente se han identificado más de 20 BMPs que en base a su secuencia y función han sido clasificadas en los siguientes subgrupos: BMP-2/4, BMP-5/6/7/8/8b, BMP-9/10 y BMP-12/13/14 (Mazerbourg y Hsueh, 2006; Miyazono y col., 2005). La citocina activa está formada por homodímeros o heterodímeros y una vez secretada, actúa en forma autocrina o paracrina a nivel de receptores de membrana plasmática (Senta y col., 2009; Lehnerdt y col., 2007; Liu y col.,

2007). La superfamilia del TGF- β está compuesta por las proteínas: TGF- β s, Nodal, activina y las BMPs (Guo y Wang, 2009). Las BMPs primeramente activan a los receptores heterotriméricos de serina/treonina quinasa específicos tipo I y II que se encuentran en la membrana plasmática. El receptor tipo I es fosforilado seguido de la activación de tipo II (Wagner y col., 2010). El receptor tipo I inicia la activación de una cascada intracelular a través de una vía canónica o no canónica. La primera vía involucra la fosforilación de R-Smads (por ejemplo a Smad-2 y 3) (Liu y col., 2007), éstos una vez activos forman complejos con co-Smad y Smad-4, y luego traslocan al núcleo para dirigir la transcripción génica. La vía no canónica activa a MAPKs y p38. Independientemente de la vía, ambas pueden desembocar en la activación del gen Runx-2 para controlar la diferenciación de los osteoblastos (Lee y col., 2002). Dentro de la superfamilia del TGF- β , las BMPs y TGF- β 1 son proteínas críticas en la regulación del remodelado óseo (Liu y col., 2007; de Gorter y col., 2011). La disrupción en la función de las BMPs y sus inhibidores (noggina, chordina, esclerostina) se asocia a una variedad de enfermedades óseas (Liu y col., 2007; de Gorter y col., 2011).

Las BMP-2, 3, 4, 6, 7, 8 y 8b son producidas por preosteoblastos y regulan en forma autocrina y paracrina su diferenciación a osteoblasto maduro (van der Horst y col., 2002). También se observó la presencia de BMPs en callos de fracturas óseas (Nakase y col., 1994; Bostrom y col., 1995; Onishi y col., 1998).

La BMP-1 es una metaloproteasa y no pertenece a la familia TGF- β (de Gorter y col., 2011; Lui y col., 2007). Existen 7 isoformas de BMP-1 que surgen por splicing alternativo del gen Bmp1. Estas variantes difieren en su región C-terminal pero comparten un dominio N-terminal con actividad proteasa, clivan la región C-terminal del procolágeno I, II, y III. Se sabe que BMP-1-1 estimula la liberación de BMP-2 y BMP-4 entre otras proteínas. (Garrigue-Antar y col., 2001; Hopkins y col., 2007; Jasuja y col., 2007).

Se ha reportado que la incorporación de BMP-2 a cultivos de osteoblastos incrementa en gran manera los niveles de OC (Huang y col., 2010; Jang y col., 2012), a su vez se demostró que la BMP-2 es necesaria para inducir la formación de hueso en forma irreversible (Noel y col., 2004), y se

sabe que su deficiencia resulta en severos trastornos de la osteogénesis (Bandyopadhyay y col., 2006). Estudios recientes indican que polimorfismos con cambio de una serina por una alanina (Ser37Ala), en un locus del cromosoma 20 que codifica para BMP-2, se encuentran sobre-expresados en pacientes con osteoporosis (Styrkarsdottir y col., 2003).

Vukicevic demostró que los osteoblastos de embriones humanos expresaban BMP-3 (Vukicevic y col., 1994). Estudios recientes muestran que la formación ósea de las extremidades se produce normalmente en ausencia de BMP-4, sugiriendo que esta citocina no es necesaria para la formación de hueso en las extremidades (Tsuji y col., 2008). Análisis genéticos de los roles de BMP-2 y BMP-4 mostraron que la pérdida de ambos producía defectos en el desarrollo de la osteogénesis (Bandyopadhyay y col., 2006)

Helder y colaboradores demostraron la presencia de BMP-7 en osteoblastos humanos y de ratón (Helder y col., 1995). Diversos reportes demuestran que BMP-7 induce la expresión de marcadores de diferenciación osteoblásticos tales como el aumento de la actividad de la FAL y mineralización acelerada por calcio (Gu y col., 2004; Shen y col., 2010).

En el hueso intramembranoso humano, se ha detectado una mayor proporción de ARNm para las BMP-2, 6 y 7 sugiriendo su mayor participación en el mantenimiento de la homeostasis durante el remodelado óseo (Senta y col., 2009). Las BMP-2 y BMP-7 han mostrado regular la proliferación, diferenciación y apoptosis de las células óseas (Wei y col., 2008; Gautschi y col., 2009; Lavery y col., 2009).

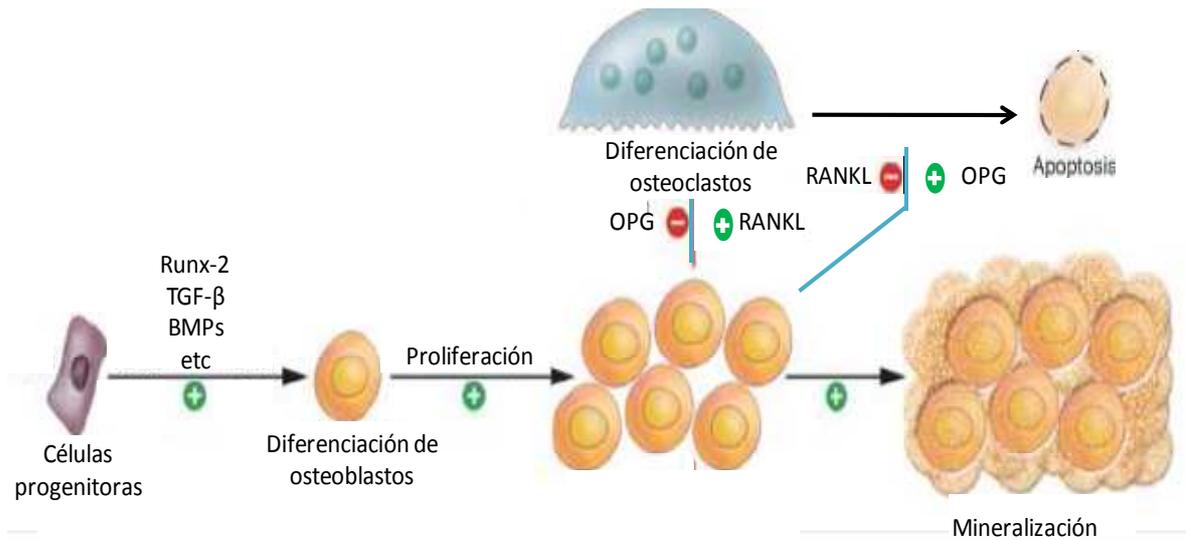


Figura 1. Regulación de los osteoblastos sobre la vía OPG/RANKL y diferenciación celular.

Reparación y remodelado óseo

Durante los movimientos, el ejercicio y la actividad física, se producen estímulos mecánicos que desencadenan una serie de respuestas celulares, entre ellas, la liberación por parte de las células óseas, de diversos factores solubles al espacio extracelular. Dichas sustancias actúan en forma endocrina, paracrina o autocrina, dependiendo de su naturaleza química, mejorando las estructuras óseas y la calidad de hueso.

Por otro lado, se sabe que luego de una fractura ósea se inicia un proceso de reparación, que conlleva proliferación, migración y diferenciación celular en el sitio de injuria. El proceso a través del cual un hueso lesionado o fracturado se repara se denomina consolidación. La consolidación ósea se desarrolla en tres etapas secuenciales que se superponen en el tiempo: inflamación, reparación y remodelación. En el transcurso de estas etapas la adhesión, proliferación, migración y diferenciación de osteoblastos son procesos fundamentales para el desarrollo y obtención de una consolidación exitosa (Fig. 2).

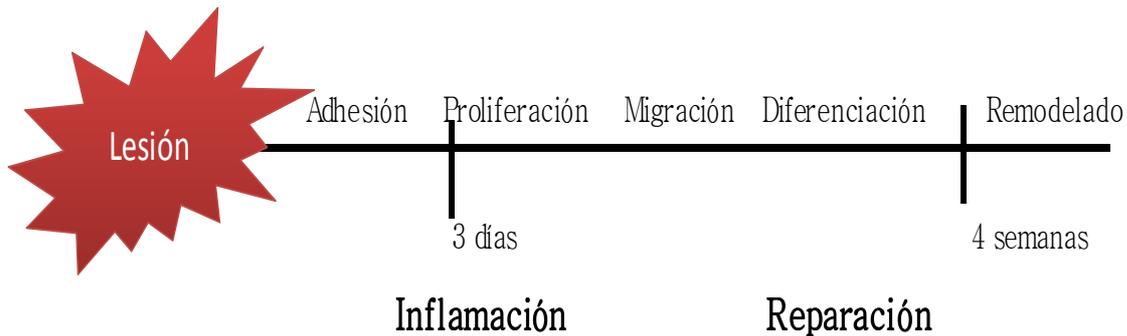


Figura 2. Proceso temporal de reparación ósea ante una lesión.

Diversos factores celulares estimulan la proliferación y diferenciación de osteoblastos. De todos los factores que intervienen en este proceso, las BMPs son sin duda las que más interés han despertado, puesto que inducen la diferenciación celular hacia el fenotipo osteoblástico.

Diferenciación osteoblástica

El proceso reversible de cambio de una modalidad celular funcional a otra se conoce como diferenciación celular. Ésta consiste en el proceso de especialización de la estructura y la función celular que tiene carácter progresivo. Según las etapas de diferenciación celular, la secuencia de desarrollo osteoblástico comprende tres fases: proliferación, síntesis de matriz y maduración, y posteriormente mineralización (Lui y col., 1994; Malaval y col., 1994).

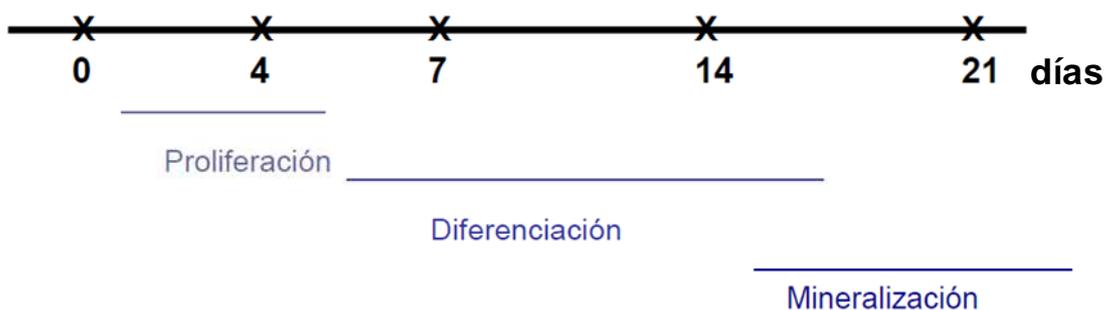


Figura 3. Esquema temporal de las fases de diferenciación celular de los osteoblastos.

La diferenciación de células indiferenciadas o parcialmente diferenciadas a osteoblastos maduros ha sido ampliamente demostrada *in vitro*. Habitualmente se realiza mediante el cultivo de una capa adherente de células indiferenciadas en un medio adecuado, denominado medio de inducción osteogénico, el cual suele incluir ácido ascórbico, glutamina, y β -glicerofosfato. Las células indiferenciadas o parcialmente diferenciadas forman en un primer momento agregados o nódulos y aumenta la expresión de la FAL. A partir de la primera semana se puede observar la aparición de depósitos de calcio, pero no es hasta la tercera semana cuando se obtiene una diferenciación completa.

La diferenciación osteogénica de células mesenquimales *in vitro* ha sido dividida, para su estudio, en tres etapas (Huang y col., 2007). La primera etapa de crecimiento celular o proliferación. La etapa intermedia (5-14^{to} día), está caracterizada por aumentos en la transcripción y expresión de la FAL, que alcanza un pico para luego declinar (Aubin, 2001). En la línea celular de fenotipo osteoblástico (SaoS2) la actividad de la FAL se ve incrementada a partir del día 7 en medio osteogénico (Li y col., 2009). También se encontró en éste estadio la expresión de Colágeno tipo I (Quarles y col., 1992), específicamente alrededor del día 11 (Sila-Asna y col., 2007; Feng y col., 2008) y de la BSP (Sila-Asna y col., 2007; Liu y col., 2008). La etapa tardía (20-28^{vo} día) se presenta con una gran expresión de OC, y OP, seguida por deposición de calcio y fosfato (Hoemann y col., 2009; Huang y col., 2007). Se ha encontrado elevada expresión de OPG en células mesenquimales alrededor del día 21 de incubación en medio osteogénico (Yang y col., 2011). Aún se discute acerca de los estadios de diferenciación en los que se expresa la ON.

El ATP extracelular como modulador de la formación de hueso

Se sabe que diferentes estímulos, a los que el hueso se encuentra expuesto, como estímulos mecánicos durante los movimientos o injuria e inflamación en los traumatismos, resultan en la liberación celular del trifosfato de adenosina (ATP) (Elliot y col., 2009). Además, se ha demostrado que la misma actividad resortiva de los osteoclastos produce la liberación al medio extracelular de ATP (Gallagher y Buckley, 2002). Una vez liberado al espacio extracelular, este nucleótido o sus productos de hidrólisis pueden actuar sobre los receptores purinérgicos de la membrana plasmática para inducir diversas respuestas en las células óseas. Efectos mitogénicos del ATP han sido reportados en diferentes tipos celulares, incluyendo a los osteoblastos (Alvarenga y col., 2010; Katz y col., 2008; Katz y col., 2011; Costessi y col., 2005).

Nucleótidos de purina y de pirimidina

Los nucleótidos se dividen en dos grandes grupos dependiendo de la base nitrogenada que los componen, estas pueden ser: bases púricas, o bases pirimidínicas.

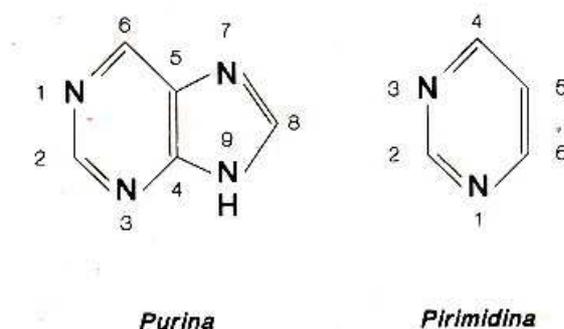


Figura 4. Bases púricas y pirimidínicas

El ATP es un nucleótido cuya base púrica es una adenina. Es una molécula utilizada por todos los organismos vivos para proporcionar energía y como precursor de varias reacciones químicas (Lehninger y col., 2005). Su

concentración intracelular es del orden milimolar (Lazarowski y Harden, 1999), más exactamente de 3-5 mM (Gallagher y Buckley, 2002).

Como se observa en la Figura 5, por hidrólisis sucesivas a partir del ATP se generan la adenosina difosfato (ADP) y la adenosina monofosfato (AMP) (Lehninger y col., 2005). De manera similar, distintos ribonucleótidos se originan según contengan como base nitrogenada a la guanina, perteneciente a la familia de las purinas, o una base de la familia de las pirimidinas, como la citosina, timina, y uracilo. Cuando la molécula no posee grupos fosfato se denomina nucleósido. La concentración intracelular del uridin trifosfato o trifosfato de uridina (UTP) se encuentra en relación 1:5 respecto al ATP (Harden y Lazarowski, 1999).

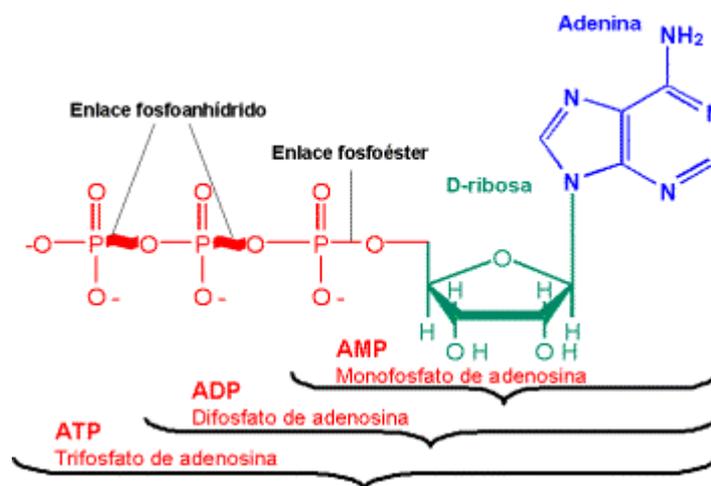


Figura 5. Estructura del ATP, ADP y AMP.

Como se menciona anteriormente, el ATP y otros nucleótidos pueden actuar como moléculas de señalización extracelular luego de ser liberados por las células. Se han reportado diversos mecanismos de liberación de nucleótidos al medio extracelular (Romanello y col., 2001; Romanello y col., 2005; Burnstock, 2006).

Mecanismos de liberación y transporte de ATP en el microambiente óseo

Para activar los receptores purinérgicos y desempeñar un rol fisiológico sobre la función osteoblástica, el ATP debe ser liberado al espacio extracelular en el microambiente óseo. Esta liberación puede ocurrir por lisis, estrés e injuria celular durante los traumatismos y fracturas o por mecanismos fisiológicos (Lazarowski y col., 2011). En cultivo primario de osteoblastos se ha observado que bajo estímulos mecánicos el ATP es liberado al medio (Genetos y col., 2005). Además, se ha reportado que el ATP es liberado en forma constitutiva desde células osteoblásticas (Buckley y col., 2003) y es el nucleótido mayoritario en el espacio extracelular. Por otro lado, perturbaciones mecánicas del medio aumentan la acumulación de ATP en el espacio extracelular (Bowler y col., 2001). La participación de proteínas ABC (del inglés, ATP-binding cassette), hemicanales de conexinas o panexinas o canales aniónicos dependientes de voltaje, como así también la liberación por exocitosis han sido propuestos como mecanismos de transporte o liberación de ATP (Burnstock, 2006; Romanello y col., 2001; Romanello y col., 2005). Además, enzimas específicas y nucleotidasas extracelulares interconvierten nucleótidos, generando o hidrolizando ATP (Buckley y col., 2003; Zimmermann, 2000; Abbracchio y col., 2006). Estos una vez liberados al espacio extracelular pueden activar a los receptores purinérgicos.

Receptores Purinérgicos

Los receptores purinérgicos se dividen en dos grandes grupos P1 y P2. Los P1 son sensibles a los nucleósidos, su agonista principal es la adenosina, y sus antagonistas son del tipo xantinas. Farmacológicamente y de acuerdo a su señalización, han sido divididos en los subtipos A1, A2a, A2b, y A3.

Los P2 han sido clasificados en la subfamilia de receptores ionotrópicos y metabotrópicos, P2X y P2Y, respectivamente. Los P2X son canales iónicos activados por ligando, forman trímeros y cada subunidad contiene dos dominios

transmembrana. Los P2Y son proteínas acopladas a proteína G, con siete dominios transmembrana (Ralevic y Burnstock, 1998; Burnstock, 2006).

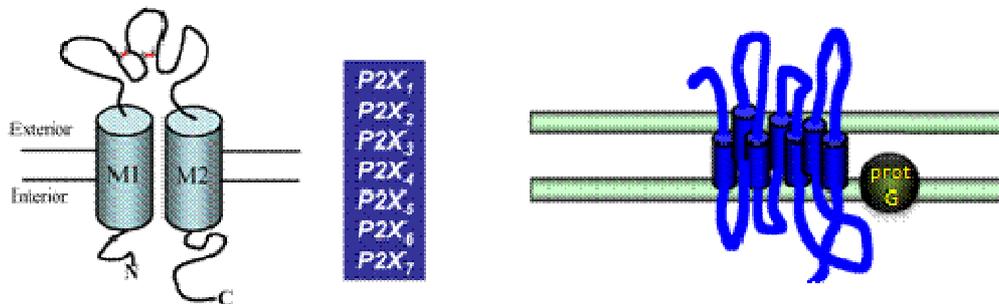


Figura 6. A la izquierda se representa una subunidad de los receptores P2X con dos dominios transmembrana (M1 y M2), y a la derecha los P2Y con sus siete dominios transmembrana.

Actualmente, siete proteínas que integran la subfamilia de receptores P2X (P2X₁₋₇) y ocho subtipos de receptores P2Y (P2Y_{1, 2, 4, 6, 11, 12, 13 y 14}) han sido clonados y funcionalmente caracterizados en vertebrados (Burnstock, 2006; Erb y col., 2006; von Kügelgen, 2006).

Interacción entre nucleótidos y receptores P2

Los receptores P2X están compuestos por homo o heterotrímeros que conforman un poro o canal y sólo son activados por el ATP. Luego de su activación permiten el influjo de sodio y calcio y el eflujo de potasio, conduciendo a la despolarización de la membrana plasmática y a la acumulación de calcio en el citoplasma celular (North y Surprenant, 2000; North, 2002). Los receptores P2Y son activados por nucleótidos de purinas y/o pirimidinas. Los diferentes subtipos de receptores P2Y pueden caracterizarse farmacológicamente en base a su capacidad de responder a los distintos nucleótidos. Básicamente todos los receptores P2Y responden al ATP. El ADP es el principal agonista de los P2Y_{1, 12 y 13} (Chhatiwala y col., 2004) y agonista parcial de los P2Y₁₁, estos subtipos no responden a UTP, en cambio los P2Y₂ y

P2Y₄ responden a UTP y no al ADP. El principal agonista del P2Y₆ es el UDP, y el receptor P2Y₁₄ es el único que responde a UDP-glucosa.

Mecanismos de señalización de receptores P2Y

De forma similar a otros miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteína G (GPCR), la estimulación de los receptores P2Y conduce a la activación de proteínas G heterotriméricas y a su disociación en las subunidades α y $\beta\gamma$, para interactuar con proteínas efectoras. En general, cada subtipo de receptor P2Y interacciona con un tipo de proteína G heterotrimérica. Los receptores P2Y₁, ₂, ₄, ₆ y ₁₁ están acoplados a la proteína G_{q/11} que activa fosfolipasa C (PLC) para generar inositol trifosfato (IP₃) y consecuentemente, aumentos transitorios en la concentración de calcio intracelular ([Ca²⁺]_i) (Bowler y col., 1999; Ralevic y Burnstock, 1998; Erb y col., 2006; von Kugelgen, 2006). La activación de los receptores P2Y₁₂, P2Y₁₃ y P2Y₁₄ causa la inhibición de la adenilil ciclasa (AC) a través de la proteína G_i. Adicionalmente, se ha reportado que P2Y₁₁ acopla también a G_s para estimular la AC y aumentar los niveles de AMPc (Erb y col., 2006).

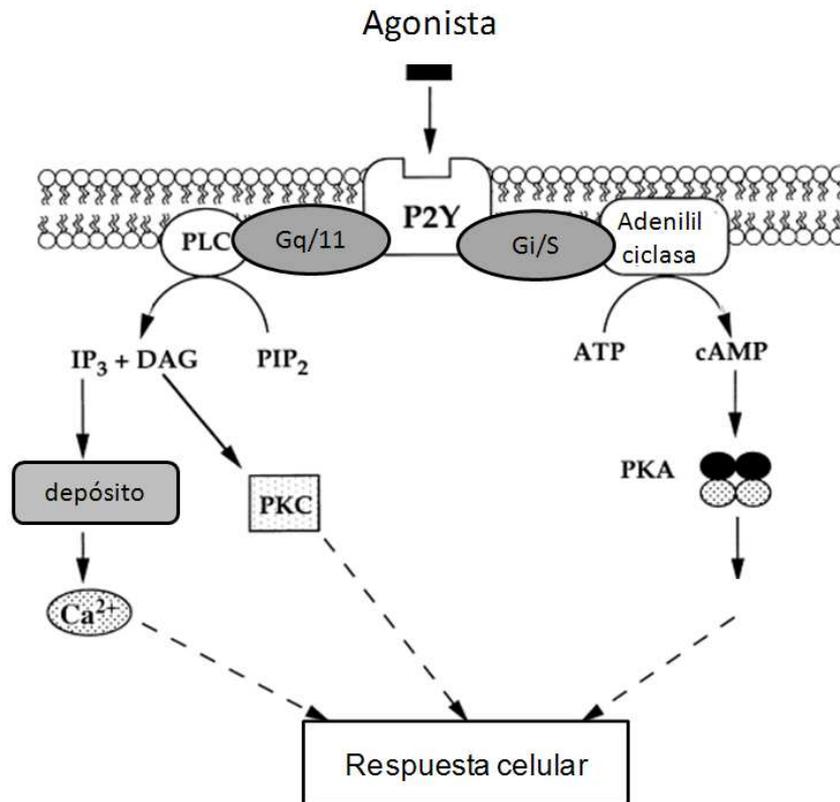


Figura 7. Vías de señalización intracelular principales de los receptores P2Y.

Señalización por receptores P2 en osteoblastos

Se ha reportado que los receptores P2Y se expresan en líneas celulares osteoblásticas y en osteoblastos de origen humano y de rata (Katz y col., 2008; Hoebertz y col., 2000; Maier y col., 1997; Bowler y col., 1995; Yu y Ferrier, 1993). Estudios realizados en osteoblastos humanos sugieren que la expresión de receptores P2Y es heterogénea dentro de la misma población celular, probablemente debido a diferencias en los estadios de diferenciación individuales (Dixon y col., 1997). Más aún, Orriss y colaboradores (2006) describen cambios en los niveles de expresión de receptores P2X y P2Y durante la diferenciación de osteoblastos de rata en cultivo primario. Ellos sugieren que los osteoblastos inmaduros expresan mayor proporción de receptores P2X, mientras que los osteoblastos maduros expresan preferencialmente receptores del subtipo P2Y₂ y en menor medida los subtipos P2Y₄ y P2Y₆. Estudios recientes reportan la expresión de todos los subtipos de

receptores P2, a excepción del P2Y₁₁, en osteoblastos de rata (Orriss y col., 2011).

Se ha observado que el ATP incrementa la concentración de Ca²⁺ intracelular en osteoblastos y en células osteoblásticas derivadas de osteosarcoma de origen humano y de rata (Kumagai y col., 1991; Schöfl y col., 1992; Shimegi, 1996; Jorgensen y col., 1997; Katz y col., 2006). La activación de receptores P2Y por ATP en osteoblastos induce la expresión de c-fos, un gen de expresión temprana que participa en la proliferación y diferenciación de las células óseas (Bowler y col., 1999). Existen evidencias de que el ATP estimula la síntesis de ADN en células osteoblásticas murinas y humanas (Shimegi, 1996; Nakamura y col., 2000; Katz y col., 2008). Además, se describieron efectos sinérgicos entre el ATP y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) sobre la proliferación celular (Shimegi, 1996). En células osteoblásticas humanas el ATP potencia los efectos proliferativos de PDGF y del factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF1) en forma dependiente de las MAPKs luego de la activación de receptores P2X (Nakamura y col., 2000). La activación de los receptores P2Y sinergiza la acción de la hormona paratiroidea (PTH) sobre la expresión de c-fos en osteoblastos (Bowler y col., 1999). Se ha reportado que los receptores P2Y₂ median la movilización de calcio intracelular inducida por estimulación mecánica en osteoblastos (You y col., 2002), sugiriendo que los nucleótidos liberados desde las células por estimulación mecánica participan en la conversión de las fuerzas mecánicas en señales bioquímicas. Asimismo, se ha demostrado que el ATP activa el factor de transcripción Runx2, involucrado en la diferenciación osteoblástica y en la respuesta al estrés mecánico (Costessi y col., 2005). Por otro lado, se ha observado que bajas dosis de ATP inhiben, a través de receptores P2Y₂, la formación de hueso e incrementan la liberación de RANKL por osteoblastos *in vitro*, resultando esto último en una estimulación de la resorción ósea en forma indirecta (Hoebertz y col., 2002; Hoebertz, 2003).

En cultivos primarios de osteoblastos de rata y en la línea celular osteoblástica ROS 17/2.8 se ha demostrado que el ATP, a través de receptores P2Y, estimula la vía de señalización de fosfolipasa C (PLC), generando aumento en la concentración de inositol trifosfato (IP₃) y de Ca²⁺ intracelular, y

activación de miembros de la familia de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y de la vía de señalización de la fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K)/proteína quinasa B (PKB o AKT), asociado a incrementos en la proliferación celular (Katz y col., 2006; Katz y col., 2008; Katz y col., 2011;). La PI3K activa, fosforila el fosfatidil inositol 3,4 difosfato (PIP2) convirtiéndolo en el segundo mensajero fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato (PIP3), el cual, corriente abajo, conduce a la activación de la proteína AKT. La AKT tiene múltiples blancos, responsables de los efectos de la activación de la vía (Hiles y col., 1992; Fruman y col., 1998; Jiménez y col., 1998).

Algunas evidencias sugieren que el ATP puede regular la osteogénesis *in vitro*, negativamente, a través de la activación de receptores P2Y₂, o positivamente, mediante la activación de receptores P2X₇ (Orriss y col., 2007; Panupinthu y col., 2008). Sin embargo, aún no han sido completamente elucidados los mecanismos involucrados en la acción del ATP sobre la osteogénesis.

Se ha reportado que el aumento de la síntesis de las BMPs involucra influjo de calcio, activación de la vía PI3K/AKT y de la cascada Erk1/2 (Lee y col., 2008; Wu y col., 2008; Tanno y col., 2003). Además, se ha evidenciado que distintos tipos de estrés como fuerzas mecánicas, ultrasonido e hipoxia, entre otros, estimulan la expresión de algunas BMPs y la formación de hueso (Ikegame y col., 2001; Tanno y col., 2003; Rath y col., 2008; Csiszar y col., 2009; Tseng y col., 2010). Por otro lado, se sabe que estímulos mecánicos incrementan la actividad de la FAL y activan la vía de señalización BMPs/Smad en osteoblastos (Wang y col., 2010). Considerando que esos estímulos podrían inducir la liberación de nucleótidos al espacio extracelular, surge la hipótesis de que la activación de receptores P2 podría modular la expresión de BMPs. Sin embargo, el rol de receptores P2 en la regulación de la expresión de BMPs y su relación con la modulación de la diferenciación de osteoblastos por ATP u otros nucleótidos no ha sido investigado hasta el presente trabajo.

Otosclerosis

La otosclerosis (del griego otós: oído + sklerós: endurecimiento), también conocida como otoresclerosis, es una enfermedad ósea primaria localizada, de la cápsula ótica y de la cadena oscicular que causa fijación de los huesecillos del oído dificultando la transmisión normal de las ondas sonoras. Se manifiesta con una pérdida de audición progresiva (hipoacusia) que lleva hacia la pérdida total de la audición. Puede ir acompañada de ruidos en los oídos (acufenos).

Se han reconocido tres fases en el desarrollo histopatológico de esta enfermedad:

1. Otorespongiosis (Fase inicial): Es una fase de congestión osteoide. El foco se origina en las inmediaciones de la pared de un vaso sanguíneo, los canalículos óseos normalmente visibles desaparecen. Las células más activas son los osteocitos, y se observa hipervascularidad
2. Fase de Transición: llamada también fase resortiva ósea, en esta fase la dilatación vascular disminuye y aparecen los osteoclastos que desde el centro de la lesión y sus alrededores realizan una reabsorción ósea de este hueso, que se ha neoforado desorganizadamente. El hueso toma un aspecto esponjoso característico
3. Otosclerosis (Fase tardía): En las zonas destruidas ocupadas por tejido conectivo, comienza a formarse tejido osteoide el cual se mineraliza, dando como resultado un hueso muy irregular, exuberante, de estructura anárquica y de tipo escleroso con propiedades mecánicas alteradas (Fig. 8).

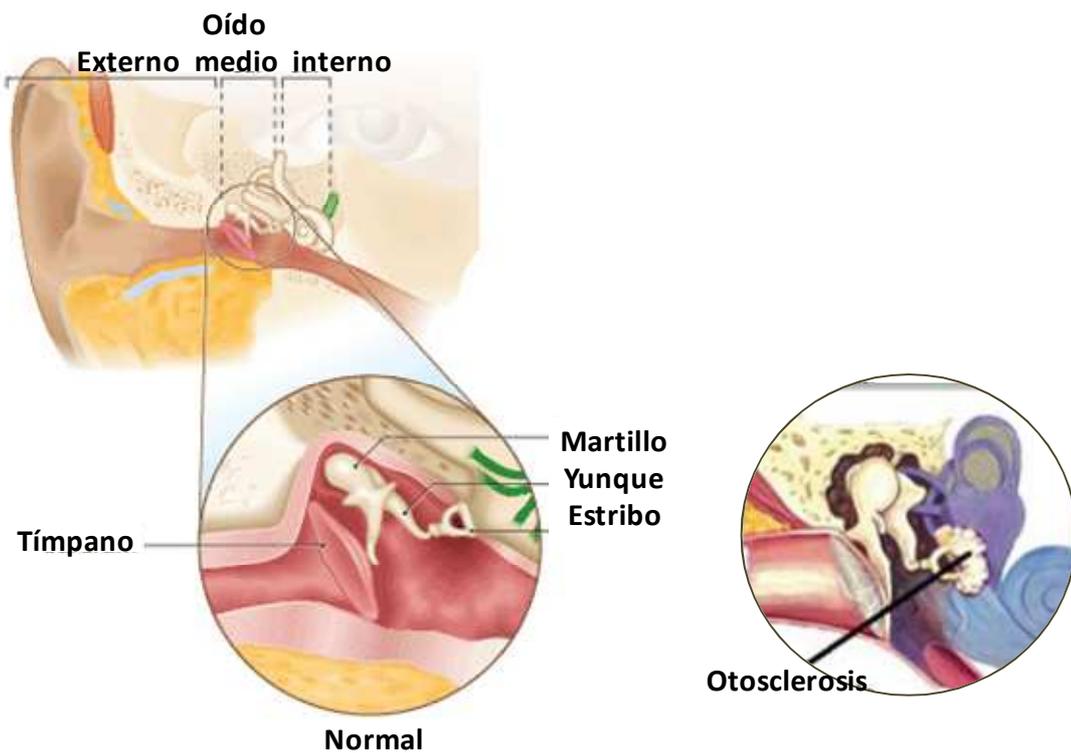


Figura 8. Esquema representativo de un oído sano (círculo de la izquierda) y uno con otosclerosis (círculo de la derecha).

Prevalencia de la Otosclerosis

La edad de comienzo de esta enfermedad es variable, aunque en la mayoría de los individuos comienza al finalizar la adolescencia (Schuknecht y Gacek, 1993; Friedmann y Arnold, 1990) y se exacerba generalmente entre los 40 y 50 años. Es más frecuente en la raza blanca (Ghorayeb y Linthicum, 1978). La relación hombre/mujer es de 1:2. La prevalencia en las mujeres es de 3% y en la población general es menor al 1%. Alrededor del 8% de los hombres y 12% de las mujeres caucásicas presentan otosclerosis, sin embargo, sólo el 10% de ellos presentan pérdida auditiva (Declau y col., 2001). El 90% de las lesiones se encuentran localizadas cerca de la ventana oval causando principalmente pérdida de la audición por fijación de los huesecillos y puede afectar a ambos oídos. Tiene exacerbaciones en períodos de alto nivel de estrógenos, como es el embarazo. Esto se explica porque el estrógeno favorece la fragilidad lisosomal, con salida de enzimas que fomentan el proceso

de otopospongiosis (Wiet, 1991). En aquellos pacientes que presentaron síntomas de otosclerosis en su vida, la existencia de otopospongiosis era bilateral en el 70-80% de las biopsias (Bretlau y col., 1971).

Diagnóstico

La historia clínica es fundamental en la evaluación del paciente, ya que estos pacientes presentan hipoacusia progresiva a lo largo de los años. Algunas veces se puede observar el signo de Schwarze, descrito como un punto rojo en el centro del tímpano. Esto es debido al aumento de irrigación alrededor de la ventana oval, por el proceso de remodelación ósea (Howard, 1985). En cuanto a los exámenes se observa: Audiograma con hipoacusia de conducción, y puede observarse cambios en las tomografías computadas o por resonancia magnética nuclear (Valvassori, 1966).

Tratamiento

Hasta el momento, no se conoce un tratamiento farmacológico específico. Los pacientes pueden utilizar audífonos mientras transitan por los primeros estadios de la enfermedad. Los tratamientos médicos con fluoruro de sodio tienen un papel muy limitado, generalmente se utiliza para frenar la aparición de acúfenos. En la mayor parte de los casos, la cirugía con remoción del hueso anómalo (estapedectomía) o el láser, y reemplazo por una prótesis, es el tratamiento de elección para la otosclerosis. Sin embargo, en algunos pacientes la cirugía no resulta exitosa, o no es aconsejable para ellos, por lo que sólo les queda afrontar la sordera.

Etiopatogenia de la Otosclerosis

La otosclerosis es considerada una enfermedad multifactorial, causada por factores genéticos e infecciosos entre otros. Varios estudios sugieren una herencia autosómica dominante con penetrancia incompleta que bordea el 40% (Gordon, 1998; Niedermayer y col., 2001; Schrauwen y Van Camp, 2010). Aunque más de 10 locus genéticos han sido mapeados, los genes específicos y sus proteínas aún no han sido identificados (Gordon, 1989; Brownstein y col., 2006; Chole y McKenna 2001; Van den Bogaert y col., 2002), sin embargo McKenna y col., (1998) demostraron una asociación de esta enfermedad con mutaciones en el gen *Col1 α 1*. Esta penetrancia disminuida se la puede relacionar con la distribución de las lesiones en la cápsula ótica. Algunas de estas lesiones se producen en zonas donde no pueden provocar pérdida auditiva (Schuknecht y Gacek, 1993; Markou y Goudakos, 2009). Por otro lado, en el 40-50% de los caso hay una falta de historia familiar positiva, esto ha sido explicado por mutaciones de novo y otros modos de herencia (Niedermayer y col., 2001; Schrauwen y Van Camp, 2010).

Respecto a la asociación viral, primeramente McKenna y col., en 1986, postularon la teoría de la etiología viral en la otosclerosis al observar estructuras filamentosas, cuya morfología era similar a nucleocápsides virales, en los osteoblastos de las lesiones otoscleróticas pertenecientes a pacientes enfermos. Posteriormente, se encontraron altas concentraciones de IgG para el virus de sarampión (MEV) en lesiones otoscleróticas activas (Arnold y Friedmann, 1987; Mckenna y Mills, 1989; Niedermeyer y col., 2000 y 2007). Desde entonces ha habido muchas investigaciones al respecto, varios grupos han descrito una asociación entre la infección con MEV y procesos inflamatorios en la otosclerosis. La presencia de MEV ha sido detectada en la zona afectada, en un alto porcentaje de los casos estudiados (Karosi y Sziklai, 2010). Estudios inmunohistoquímicos en biopsias de pacientes enfermos han demostrado la expresión de proteínas de la nucleocápside de MEV en condrocitos, osteocitos, macrófagos, osteoblastos y osteoclastos (McKenna y Mills, 1990; Arnold y col., 1989). Por otro lado, fue detectada la presencia de las proteínas virales en muestras de estribo y cóclea de pacientes

otoscleróticos (Niedermayer y col., 2001). Muestras en las que también fue posible detectar ARN viral mediante RT-PCR (Niedermayer y col., 2000 y 2001 y 1994; McKenna y col., 1996).

La infección persistente de MEV en las células óseas de la cápsula ótica provocaría un aumento en los niveles del receptor CD46, utilizado por este virus para adsorberse a dichas células e iniciar la infección (Karosi y col., 2007). Dado que la actividad y la diferenciación de osteoclastos está regulada por los osteoblastos, las anomalías ocurridas en estos últimos podrían ser de gran importancia en el desarrollo de esta enfermedad. Asimismo, la infección de osteoblastos en la región afectada provocaría una activación de osteoclastos embrionarios quiescentes CD51+/CD61+ que serían la base de la inflamación que llevaría al remodelado óseo anómalo de la cápsula ótica (Karosi y col., 2006).

Se determinó que la incidencia de otosclerosis es notablemente inferior en pacientes que recibieron la vacuna antisarampionosa en comparación con los pacientes que no fueron vacunados (Niedermayer y col., 2001; Karosi y col., 2006; Schauwen y col., 2006). Es importante aclarar que la introducción de la vacunación fue en 1974 y el estudio de Niederman y col. (2001) se realizó a partir del año 1993, y que no se trata de un caso de inmunidad de grupo, dado que la otosclerosis se produce por una infección persistente de MEV, en la cual la infección se adquiere mucho antes de que aparezcan los síntomas.

A pesar de lo expuesto, aún perduran algunos grupos de investigación que sostienen que no existe asociación entre la infección por MEV y la otosclerosis, fundándose en que hasta el momento no se ha podido aislar a MEV desde tejidos otoscleróticos, y en que no existe un modelo animal para esta enfermedad que ocurre exclusivamente en el oído medio de los seres humanos.

Otosclerosis y Paget

Cabe destacar que existe una gran similitud entre la enfermedad de Paget y la otosclerosis, en cuanto a que ambas cursan con elevado

remodelado óseo, debido a la hiperactividad de osteoclastos y osteoblastos, que resorben y que generan hueso respectivamente. Además, en ambas enfermedades se han encontrado evidencias de infección con paramixovirus, grupo al cual pertenece MEV, con la salvedad de que la otosclerosis presenta una distribución esquelética focal, mientras que en Paget la distribución es generalizada mostrando afección en diversos huesos a la vez. Los hallazgos de diferentes estudios ultraestructurales, inmunohistoquímicos, hibridación *in situ* y biológicos son compatibles con una infección por MEV. Se encontraron inclusiones intracelulares, típicas de este virus, que reaccionaban con anticuerpos dirigidos contra las proteínas de las nucleocápsides del virus respiratorio sincicial (RSV) y del MEV (Mills y col., 1981). Incluso se detectó ARNm correspondiente a proteínas de las nucleocápsides del MEV en los osteoclastos y osteoblastos de pacientes con enfermedad de Paget (Basle y col., 1986).

Los virus

Los virus son organismos particulados infecciosos, de tamaño microscópico, capaces de infectar a todos los tipos de seres vivos, desde vertebrados hasta bacterias y arqueas. Los genomas virales pueden ser de ADN o ARN, en sus formas de simple y doble cadena y son en general mucho más pequeños que los de las células a las que infectan. Al no tener toda la información necesaria para replicar por sí mismos requieren de una célula hospedadora para proveerse de los materiales, la maquinaria y la energía necesaria para formar nuevas partículas. En virtud de la estrecha relación de los virus con la célula a la que infectan, es difícil encontrar compuestos capaces de combatirlos de manera específica y, aún hoy, muchas de las enfermedades virales de humanos no tienen tratamiento.

La habilidad de los virus para ingresar su genoma y proteínas dentro de la célula hospedadora, así como el subsecuente uso de la maquinaria metabólica de la misma, es esencial para su ciclo de replicación. A pesar de esta característica en común, son diversos en estructura, genética y estrategias

de replicación, lo que da origen a distintos tipos de interacciones virus-hospedador por lo que resultan herramientas muy útiles para investigar fenómenos biológicos, bioquímicos y celulares en general.

La familia *Paramyxoviridae*

Los virus de la familia *Paramyxoviridae* son virus envueltos con un diámetro de entre 150 y 300 nm. Poseen genoma de ARN de simple cadena de polaridad negativa. Dentro de esta familia podemos encontrar dos subfamilias, donde cada una contiene diversas clases de géneros virales (Figura 9), y frecuentemente suma nuevos integrantes. Contiene a la mayoría de los virus más infecciosos y prevalentes en el hombre: RSV, parainfluenza, el virus de la papera, el virus de Sarampión o MEV (*del inglés Measles Virus*) (Norrby y Oxman, 1990), entre otros.

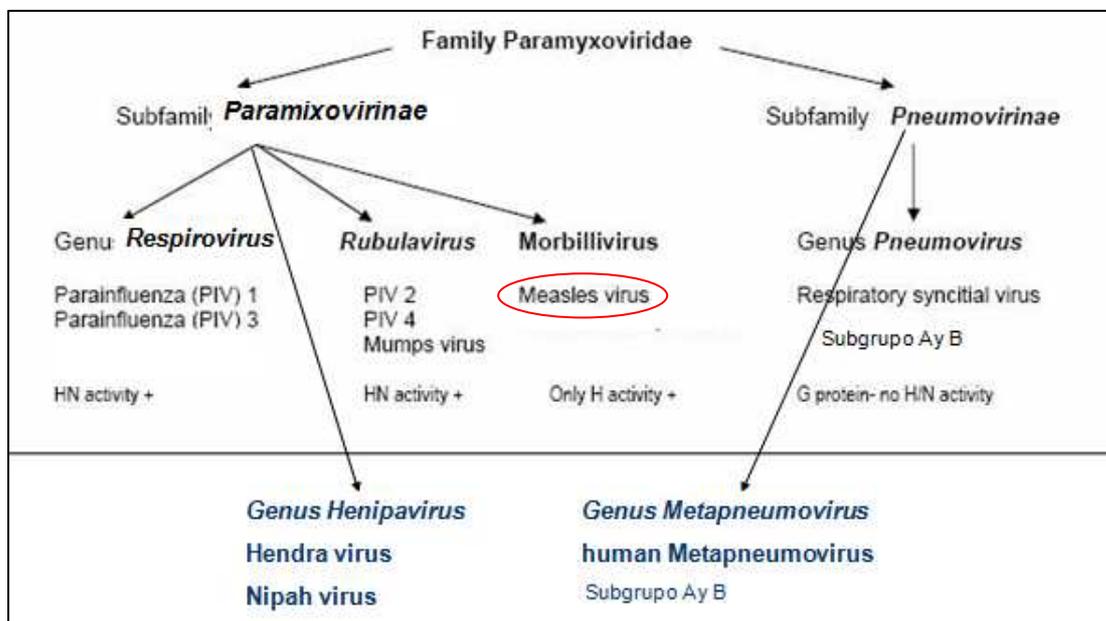


Figura 9. Familia *Paramyxoviridae*, con sus correspondientes subfamilias y géneros.

Virión del Sarampión

MEV posee seis proteínas estructurales, de las cuales, tres forman un complejo con el ARN (N: nucleoproteína, P: fosfoproteína, y L: proteína grande) y las restantes están asociadas a la membrana viral (H: hemaglutinina, F: proteína de fusión, y M: proteína de la matriz). No contiene neuraminidasa. Las proteínas F y H son muy importantes en la patogenia viral. F es responsable de la unión de la membrana viral a la de la célula hospedadora, lo que permite la entrada del virus a la célula, y H permite la adsorción del virus a la célula. Dentro de la envoltura se encuentra la nucleocápside helicoidal de 1,2 μm de longitud compuesta por proteínas estructurales y el genoma viral de ARN sencillo de polaridad negativa no segmentado de entre 15 y 19 kB (Lund y col., 1984) (Fig. 10). La proteína P para cumplir su función debe estar altamente fosforilada, y se sabe que junto a la proteína L forma la polimerasa viral que interviene en la síntesis del ARN viral. La proteína M es la más abundante, y la asociación entre ellas y la nucleocápside puede ayudar en la formación de la partícula viral.

Su ARN negativo sirve de templado para: la síntesis de mensajeros subgenómicos y para un ARN antígenómico (de polaridad positiva) molde para la síntesis del ARN negativo genómico (de polaridad negativa). Su genoma se encuentra inmerso en una cápside de simetría helicoidal. Ambos (genoma y cápside) conforman la nucleocápside. Ésta se encuentra cubierta con una membrana o envoltura viral pleomórfica, la cual proviene de la membrana celular de la célula hospedadora que infectó (Norrby y Oxman, 1990).

MEV entra a la célula por fusión de membranas, utilizando distintos receptores celulares según el tipo celular que infecta (Racaniello, 2011). Las dos glicoproteínas de la envoltura viral, H y F, son las responsables de la entrada del virus a la célula. La interacción específica entre H y sus receptores celulares son un paso clave en el éxito de la infección viral. Han sido identificados tres receptores para H en el hombre dependiendo del tipo celular que se trate, la molécula CD46, la molécula de activación de los linfocitos (SLAM, también llamada CD150) y la molécula de adhesión Nectina-4 (Plempner y col., 2011; Mühlebach y col., 2011; Noyce y col., 2011). SLAM se encuentra

expresado en timocitos inmaduros, linfocitos activados, macrófagos y células dendríticas. CD46 se encuentra presente en todos los tipos celulares incluyendo los osteoblastos, salvo en los eritrocitos (Ignatius y col., 2011). La nectina-4 está presente en células epiteliales y en diversos tipos de cánceres, entre otras células (Sato y col., 2012). Tras la entrada, el virus se desnuda por un mecanismo desconocido y queda en el citoplasma, donde desarrollara todo su ciclo de infección. Como todos los virus de polaridad negativa, los viriones de esta familia han de traer consigo una polimerasa dependiente de ARN, que esta codificada en su genoma y es capaz de transcribir el genoma viral. Sin embargo la síntesis de ARNm viral se da solo tras el desnudamiento del virus en la célula hospedadora y la síntesis de ARN genómico tras la transcripción y traducción de proteínas virales, cuando suficiente cantidad de proteína N, que estabiliza el proceso de transcripción, ha sido sintetizada. Las espículas que formarán parte de la envoltura siguen la vía secretoria y son acumuladas sobre la membrana celular, estas serán responsables de las actividades de hemoaglutinación, neuraminidasa y hemólisis. El proceso de transporte de estas proteínas hacia membrana ha sido ampliamente estudiado, y de hecho, mucho de lo que se sabe de transporte de proteínas ha sido descubierto estudiando el transporte de proteínas de MEV e influenza (Doms y col., 1993, Helenius, 1994). Sin embargo, todavía no se conoce con exactitud el proceso por el cual los viriones se ensamblan en membrana.

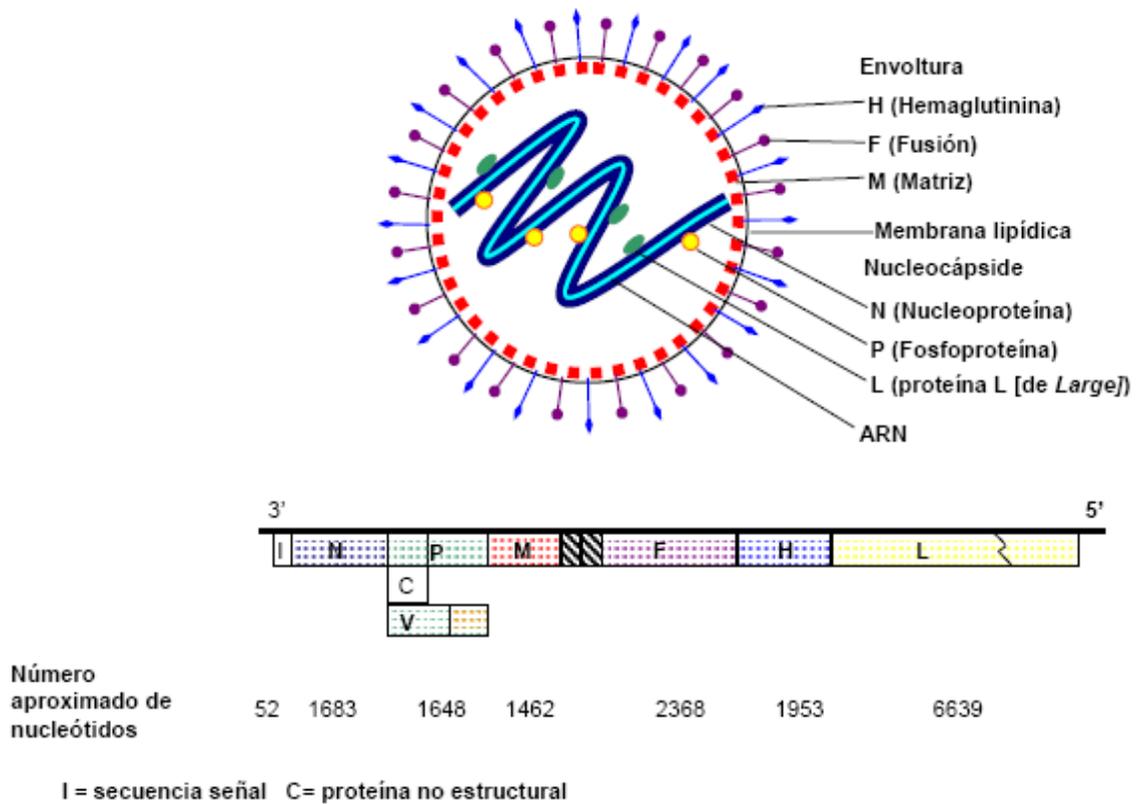


Figura 10. Esquema representativo de MEV.

Clínica y epidemiología

MEV se transmite por vías respiratorias y es uno de los virus más contagiosos que se conocen ya que cada individuo infectado puede causar entre 15 y 20 infecciones secundarias (Racaniello, 2011). Durante el transcurso de la patología, los enfermos desarrollan fiebre prodrómica, malestar generalizado, rinitis, conjuntivitis, inmunosupresión transitoria, tos y rash cutáneo característico (Hilleman, 2002, Plemper y Snyder, 2009). Generalmente la infección es controlada por el sistema inmune de los pacientes, sin complicaciones. Sin embargo, la enfermedad propia puede derivar en una inmunosupresión severa que puede traer consigo enfermedades oportunistas asociadas a sarampión (Sabella, 2010). Las complicaciones más severas incluyen neumonía, que es responsable de la mayor parte de las muertes asociadas al sarampión (Duke y Mgone, 2003), encefalitis aguda del sarampión (Perry y Halsey, 2004), encefalitis esclerosante (Reuter y Schneider-

Schaulies, 2010), diarrea, estomatitis, hepatitis subclínica y otitis media (Hilleman, 2002; Sabella, 2010). El sarampión es una de las mayores causas de muerte infantil y sigue siendo común en países en vías de desarrollo con infraestructura sanitaria pobre. En 2010 se registró un promedio de 16 muertes por hora por sarampión, la mayoría niños menores de 5 años (WHO Fact sheet 286, 2012).

A pesar de la existencia de una vacuna efectiva contra MEV, en la mayoría de los países del mundo hay un déficit de vacunación ya sea por carencias en los sistemas de salud, por creencias religiosas o por elección debido a asociación infundada entre la vacuna, el autismo y la enfermedad de Crohn (Hilleman, 2002). La WHO recomendó una cobertura de vacunación mínima de la población del 95% para poder eliminar a MEV. Sin embargo esto no ha sido logrado siquiera en muchos países desarrollados (Muscat y col., 2009). En Reino Unido entre 1999 y 2011, la vacunación no superó nunca el 90% y allí MEV fue nuevamente declarado endémico en 2008 (Editorial team 2008, UK Health protection agency, 2011). Esta situación resultó en numerosos brotes entre 2006 y 2008 en varios países europeos como Suiza, Alemania, España, Rumania, Italia, Bélgica, Reino Unido, Noruega y Austria (Muscat y col., 2009; Wichmann y col., 2007).

Tratamiento, prevención y situación epidemiológica en Argentina

Actualmente no existen antivirales aprobados para el tratamiento del sarampión. El análogo nucleosídico ribavirina (RIB) (1- β -D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-carboxamida), análogo de la guanósina (Fig. 11), se utiliza como monoterapia o en combinación con inmunoglobulinas y ha sido probado en clínica médica con éxito variable (Barnard, 2004; del Toro-Riera y col., 2006; Hosoya, 2007). Sin embargo, se han registrado efectos secundarios graves como anemia hemolítica y teratogenicidad para los pacientes y los médicos/enfermeros que administran la droga, por lo que su uso se limita a los casos más severos (Roberts y col., 2010; Shiffman, 2009; Mori y col., 2011).

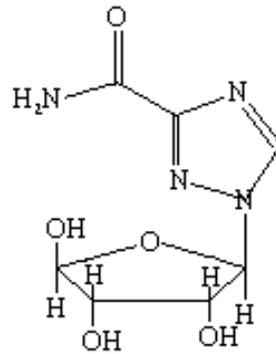


Figura 11. Estructura química de la ribavirina.

Inhibidores antisentido, péptidos, extractos naturales, análogos nucleosídicos y otras moléculas pequeñas han sido evaluados *in vitro* contra MEV; sin embargo, ninguno de estos compuestos ha sido probado en ensayos clínicos por su elevada toxicidad o falta de poder antiviral (Barnard y col., 2004, Plemper y Snyder, 2009).

La vacuna antisarampionosa, constituida por cepas atenuadas de MEV, está incluida en el Calendario Nacional de Vacunación en la vacuna Triple Viral junto con Rubeola y Parotiditis. Se aplica a niños en una primera dosis al año de edad y luego en una segunda dosis, en el momento del ingreso escolar a los 6 años.

Existe solo un serotipo de MEV, pero los virus salvajes presentan una gran variabilidad genética. La WHO reconoce 23 genotipos de MEV (cuadro 1). Esta variación del genotipo no parece tener importancia biológica, pues no modifica la eficacia de la vacuna.

Genotipo	Estado ^a	Cepas de referencia ^b	Número de acceso del gen de la hemaglutinina	Número de acceso del gen de la nucleoproteína
A	Activo	Edmonston-wt.USA/54	U03669	U01987
B1	Inactivo	Yaounde.CAE/12.83 “Y-14”	AF079552	U01998
B2	Activo	Libreville.GAB/84 “R-96”	AF079551	U01994
B3	Activo	New York.USA/94	L46752	L46753
		Ibadan.NIE/97/1	AJ239133	AJ232203
C1	Activo	Tokyo.JPN/84/K	AY047365	AY043459
C2	Activo	Maryland.USA/77 “JM”	M81898	M89921
		Erlangen.DEU/90 “WTF”	Z80808	X84872
D1	Inactivo	Bristol.UNK/74 (MVP)	Z80805	D01005
D2	Activo	Johannesburg.SOA/88/1	AF085198	U64582
D3	Activo	Illinois.USA/89/1 “Chicago-1”	M81895	U01977
D4	Activo	Montreal.CAN/89	AF079554	U01976
D5	Activo	Palau.BLA/93	L46757	L46758
		Bangkok.THA/93/1	AF009575	AF079555
D6	Activo	New Jersey.USA/94/1	L46749	L46750
D7	Activo	Victoria.AUS/16.85	AF247202	AF243450
		Illinois.USA/50.99	AY043461	AY037020
D8	Activo	Manchester.UNK/30.94	U29285	AF280803
D9	Activo	Victoria.AUS/12.99	AY127853	AF481485
D10	Activo	Kampala.UGA/51.00/1	AY923213	AY923185
E	Inactivo	Goettingen.DEU/71 “Braxator”	Z80797	X84879
F	Inactivo	MVs/Madrid.SPA/94 SSPE	Z80830	X84865
G1	Inactivo	Berkeley.USA/83	AF079553	U01974
G2	Activo	Amsterdam.NET/49.97	AF171231	AF171232
G3	Activo	Gresik.INO/17.02	AY184218	AY184217
H1	Activo	Hunan.CHN/93/7	AF045201	AF045212
H2	Activo	Beijing.CHN/94/1	AF045203	AF045217

^a Genotipos activos aislados en los 15 últimos años.

^b Nombre de la OMS. Los demás nombres que se han usado en las publicaciones científicas aparecen entre comillas.

Cuadro 1. Cepas de referencia que se deben utilizar en el análisis genético de los virus de sarampión de tipo salvaje.

Desde el año 2000, Argentina no registra circulación autóctona de MEV, sin embargo, actualmente está circulando con intensidad en Inglaterra, el continente europeo y otras partes del mundo. Por todo esto MEV sigue siendo un gran problema a nivel mundial por el movimiento en masas de los individuos. Es importante que las personas que vayan a viajar a esos destinos, se vacunen contra este virus para evitar la reintroducción de este virus en Argentina. Son inmunes a la enfermedad quienes acreditan esquema completo de vacunación al año de vida, los mayores de 50 años que hayan sufrido la

enfermedad; las personas entre 5 y 50 años que recibieron al menos dos dosis de la vacuna y los que acrediten haberse vacunado contra el sarampión y la rubéola durante las campañas nacionales. El Ministerio de Salud de la Nación emitió un alerta epidemiológico ante la detección de un caso de sarampión en la ciudad de Buenos Aires, el 24 de mayo del 2012: tratándose de una mujer de 35 años, residente en esta ciudad, que volvió al país tras estar en Europa durante cuatro semanas. Dado que en la Argentina no se registra circulación viral de sarampión autóctona desde hace doce años, la aparición de un solo caso se considera brote.

La caracterización molecular de MEV es un componente importante de la vigilancia, ya que proporciona un método de determinación del origen geográfico y de rastreo de las vías de transmisión de un virus. Asimismo ofrece una herramienta valiosa de medición de la eficacia de los programas de control y eliminación de MEV y provee información que puede servir en la confirmación de la interrupción de transmisión endémica del sarampión. La secuencia de los 450 nucleótidos que codifican los últimos 150 aminoácidos del extremo carboxi-terminal de la proteína N, constituye la cantidad mínima de datos necesarios a la determinación del genotipo de MEV.

La familia *Arenaviridae*

La familia *Arenaviridae* está constituida por un grupo de virus envueltos con genoma de ARN de polaridad ambisentido, segmentado. Hasta el momento la familia consta de 23 especies reconocidas por el “International Committee on Taxonomy of Virus” y 8 nuevas especies tentativas aún no incluidas en la familia. Estos virus poseen partículas pleomórficas y con un diámetro aproximado de entre 50 y 300 nm (Veza, 1978). Al microscopio electrónico se observa en la superficie de las partículas, espículas proyectadas hacia el exterior y gránulos electro-densos en su interior (Fig. 12), característica que les dio el nombre de “arenavirus”.

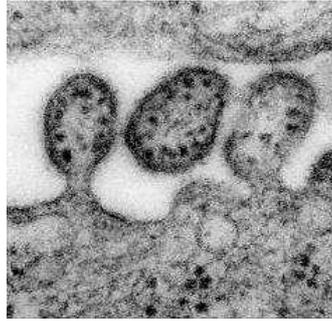


Figura 12. Microfotografía electrónica de partículas virales perteneciente a la familia Arenaviridae.

Todos sus miembros con excepción del virus Tacaribe utilizan a los roedores como reservorios naturales, infectándolos crónicamente. Según su origen se dividen en dos grandes grupos: los del Viejo Mundo y los del Nuevo Mundo (Howard y col., 1985) (Fig. 13).

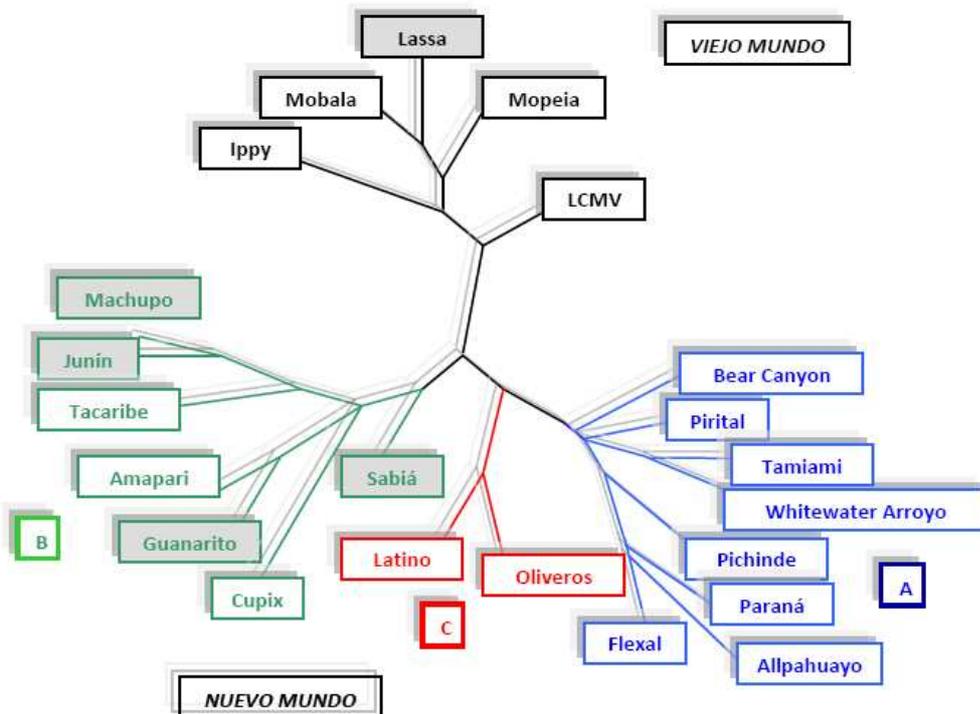


Figura 13. Relación filogenética entre los arenavirus en base al análisis del segmento S del ARN. Los cuadros sombreados indican las especies causantes de fiebres hemorrágicas en humanos.

Virión de Junín

El virus de Junín (JUNV) pertenece a la familia *Arenaviridae*, género *Arenavirus*, y tiene morfología esférica u oval con diámetros entre 110 y 130 nm (Lascano y Berria, 1971 y 1974) (Fig. 14). Las partículas virales están compuestas por una envoltura lipídica, en su interior se encuentra el genoma el cual consta de dos moléculas de cadena simple de ARN.

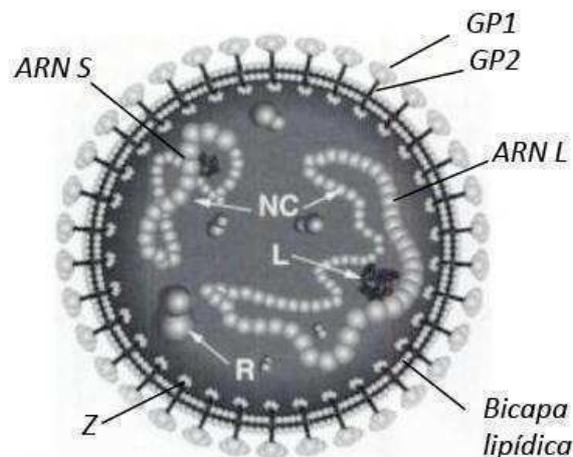


Figura 14. Esquema de una partícula de JUNV y sus principales componentes. NC: nucleocápside, L: ARN polimerasa, R: ribosoma, Z: proteína Z, GP1 y 2: glicoproteína 1 y 2 respectivamente.

Cada una de las moléculas de ARN difiere en tamaño y posee dos marcos de lectura abiertos, no superpuestos, y de polaridad opuesta lo que le permite una estrategia de replicación en “ambisentido” (Auperin y col., 1984). El segmento S (small: de aproximadamente 3.5 kb) codifica proteínas estructurales, tales como la nucleoproteína (N) y el precursor de las glicoproteínas (GP), el cual es procesado post-traduccionalmente para dar las dos glicoproteínas maduras: GP1 (adsorción al receptor) y GP2 (fusión) (Buchmeier, 2002; Meyer y col., 2002). El fragmento L (large: de 7 kb) codifica los genes para la síntesis de la ARN polimerasa viral dependiente de ARN y una proteína pequeña denominada Z por su capacidad de asociarse a moléculas de Zinc. Las moléculas de ARN se encuentran conformando un

complejo ribonucleoproteico o nucleocápside en el interior del virión, constituido principalmente por el ARN correspondiente junto con las proteínas N y L.

Ciclo de replicación

El ciclo de multiplicación de los arenavirus comienza con la unión de la GP1 al receptor celular. JUNV utiliza como receptor al receptor de transferrina 1 humano (TfR1) (Radoshitzky y col., 2007). La internalización de JUNV provoca la activación del camino de señalización de PI3K/AKT (Linero y Scolaro, 2009) y es dependiente de la red de actina y de microtúbulos de la célula (Gomez y col., 2011; Martinez y col., 2008). La transcripción y la replicación del genoma viral ocurren en el citoplasma. A partir del procesamiento de las GP en el retículo y aparato de Golgi, el ensamblado y brotación de los viriones se produce en la membrana celular pero se desconocen los eventos que determinan la salida del virus. En general se asume que el ensamblado de las partículas virales es iniciado por interacciones entre el dominio citoplasmático de una proteína viral de membrana y los componentes internos de la partícula, principalmente con la proteína de matriz, Z.

Clínica y epidemiología

La fiebre hemorrágica argentina (FHA), localmente denominada mal de los rastrojos o mal de O'Higgins, es una enfermedad zoonótica, que afecta el área central de la Pampa húmeda. La zona endémica de la FHA abarca las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fé y de La Pampa (Fig. 15), con una población estimada en riesgo de 5 millones, compuesta principalmente por trabajadores rurales.

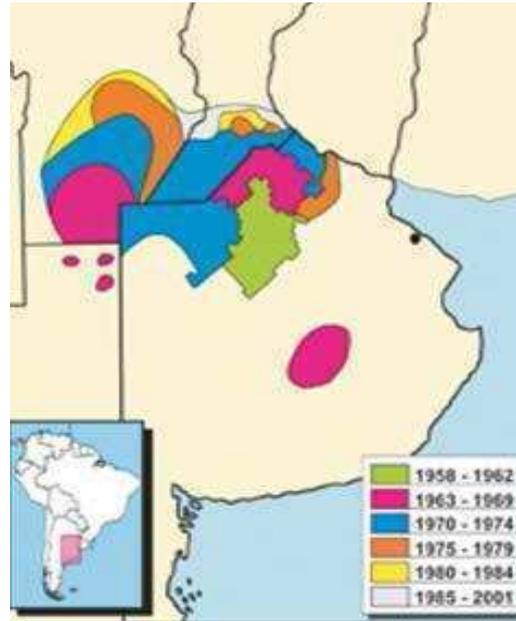


Figura 15. Localización del área endémica para JUNV en la República Argentina (Ambrosio y col., 2006).

El principal reservorio natural de JUNV es el roedor de hábitos rurales *Calomys musculus*, también se ha aislado de *Calomys laucha*, *Akodon azarae* y *Oryzomys flavescens* (Maiztegui, 1975) y en roedores urbanos como el *Mus musculus* (ratón común) (Sabattini y col., 1985). El pequeño roedor conocido localmente como ratón maicero, sufre una infección crónica asintomática, y disemina el virus a través de su saliva, orina y/o sangre infectando a otros ratones y al hombre accidentalmente. La infección al humano se produce a través de contacto con la piel (con excoriaciones), en mucosas (ojos) o inhalación de partículas (aerosoles) contaminadas con el virus. El virus ingresa al organismo por inhalación y en la mayoría de los casos se deposita en los bronquiolos. Al alcanzar el sistema linfático se esparce sistémicamente sin dejar un foco neumónico aparente (Kenyon y col., 1992).

La FHA es una enfermedad grave de desarrollo agudo que comienza como una gripe vulgar y termina progresando, en un 20 a 30% de los casos, hacia un cuadro hemorrágico fatal mientras que el resto de los enfermos se recupera. El tiempo de incubación del virus es de entre 10 a 12 días, apareciendo luego los primeros síntomas inespecíficos. En menos de una semana los síntomas se intensifican, produciéndose alteraciones vasculares,

renales, hematológicas y neurológicas. Este estadio no dura más de 20 días. En los casos fatales, la mayoría de las lesiones consisten en una vasocongestión generalizada con múltiples hemorragias en diferentes órganos. El sangrado profuso, es presumiblemente consecuencia del daño vascular ocasionado por el aumento de citoquinas y virus combinado con una marcada trombocitopenia (Molinas y col., 1989; Heller y col., 1995). Aunque la replicación viral en el tejido vascular no ha sido demostrada hasta el momento, se ha encontrado que principalmente linfocitos y monocitos de sangre periférica constituyen el sitio primario de replicación del virus (Ambrosio y col., 1986).

Prevención y tratamiento de la FHA

La vacuna a virus vivo llamada Candid #1 (candidate 1) presenta un alto grado de atenuación de la virulencia (Enria y Barrera Oro, 2002). Ésta vacuna mostró una eficacia del 95% en la protección contra la FHA. Además en el 90% de los voluntarios se registraron anticuerpos neutralizantes hasta 10 años luego de su vacunación (Maiztegui y col., 1998).

La única droga antiviral conocida actualmente en uso para los arenavirus es la ribavirina (RIB), que mostró capacidad inhibitoria, tanto *in vitro* como en modelos animales (Weissenbacher y col., 1986). Este es un compuesto de amplio espectro de acción con otros virus a través de 3 mecanismos diferentes. Luego de la fosforilación, como monofosfato, actúa como inhibidor competitivo de la inosín-monofosfato deshidrogenasa (IMPH), bloqueando la conversión del IMP a monofosfato de xantosina (XMP), precursor de la síntesis de guanosín-trifosfato (GTP) y dGTP, por lo que disminuye el GTP intracelular (Streeter y col., 1974). Además RIB puede fosforilarse a la forma 5-trifosfato, afectando la iniciación y elongación del ARNm viral por inhibición competitiva con las enzimas que agregan el CAP en el extremo 5' del ARNm y polimerasas virales (Goswami y col., 1979). Por último, un mecanismo propuesto es su acción mutagénica. Todos los virus con genoma ARN poseen una alta tasa de mutación durante sus replications debido a la pobre fidelidad de las ARN polimerasas. La acción de RIB aumenta notablemente estos errores llegando a

producir un mayor número de mutaciones letales (Crotty y col., 2000 y 2001). Se ha demostrado que RIB inhibe *in vitro* la replicación de JUNV pero no reduce la mortalidad en casos avanzados de FHA (Enria y Maiztegui, 1994).

La aplicación de anticuerpos neutralizantes de origen humano presentes en el suero de convalecientes, a los pacientes durante los primeros 8 días de la infección neutraliza la viremia, disminuye las alteraciones fisiológicas y reduce la incidencia de las enfermedades oportunistas, disminuyendo la tasa de mortalidad al 1-2% de los pacientes afectados (Maiztegui y col., 1998).

BMPs vs infección viral

Se sabe que las BMPs, además de su acción sobre los osteoblastos, regulan la respuesta inmune innata frente a múltiples infecciones mediante la modulación de la inflamación, controlan la apoptosis celular inducida por la infección viral, y la replicación de diversos virus tales como poliomavirus (Abend y Imperiale, 2008), reovirus (Beckham y Parker, 2008; Beckham y col., 2009), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Cotter y col., 2008; Enam y col., 2004), virus epstein barr (Fukuda y col., 2001), virus de la hepatitis C (Huang y col., 2007), herpes virus humano tipo 8 (Bull y col., 2008), herpes simplex tipo I (Hamza y col., 2007), etc.

Durante los últimos años, las BMPs y sus receptores han mostrado contribuir a la patogénesis de la otosclerosis (Lehnerdt y col., 2007 y 2008). Además, recientemente se demostró que, biopsias de huesecillos del oído medio de pacientes con otosclerosis activa, presentaban un nivel de expresión incrementado de BMP-2, 4, 5, y 7, mostrando una fuerte asociación con el diagnóstico histológico de la otosclerosis (Csomor y col., 2012; Schrauwen y col., 2008; Liu y col., 2007). También, en estos focos otosclerosos se ha encontrado una incrementada expresión de TGF- β , TNF- α , e inhibidores de la apoptosis (Chole y Mckenna, 2001; Lehnedrt y col., 2008; Thys y col., 2007; Csomor y col., 2010).

AKT vs infección viral

Se ha comprobado que la infección *in vitro* de distintos tipos de cultivos celulares con MEV lleva a una regulación negativa de la fosforilación de AKT, especulándose que esta modulación podría disminuir la respuesta inmune innata montada frente a la infección viral (Carsillo y col., 2010). A su vez, *in vitro*, la sobreexpresión de AKT no influye en la replicación de MEV, pero afecta su liberación (dependiendo del tipo celular) (Carsillo y col., 2010). Por todo ello se postula que ésta modulación, de la vía PI3K/AKT, podría regular entonces negativamente la acción del ATP sobre los osteoblastos mencionada anteriormente. JUNV también es capaz de modular la vía PI3K/AKT en fibroblastos de riñón de mono. La internalización de JUNV provoca la activación del camino de señalización de PI3K/AKT (Linero y Scolaro, 2009). Este virus, al igual que MEV, causa infecciones persistentes que modifican las propiedades biológicas del cultivo (Ellenberg y col., 2007). Por otro lado, la infección con JUNV es capaz de modular la fosforilación de eIF2alfa, factor involucrado en el inicio de la síntesis proteica y responsable de la formación de gránulos de estrés frente al tratamiento del cultivo con inductores tales como arsenito de sodio (Linero y col, 2011), por lo que la infección de osteoblastos con este virus podría interferir en la síntesis de BMPs cuando éstos son estimulados por ejemplo mecánicamente o con agonistas purinérgicos.

Hipótesis de trabajo

Se plantea como hipótesis de trabajo que el ATP extracelular, a través de la activación de ciertos receptores P2, modula la diferenciación de osteoblastos de rata induciendo cambios en los niveles endógenos de distintas BMPs. Además, se postula que los efectos ejercidos por los agonistas purinérgicos sobre los osteoblastos podrían ser alterados en presencia de una infección viral en dichas células.

Objetivos

Dado el marco teórico y experimental planteado, en este trabajo de Tesis Doctoral, se propone estudiar la participación de receptores purinérgicos P2 en la regulación por ATP de la proliferación y diferenciación de osteoblastos calvariales de rata neonata cultivados *in vitro* pre y post infección con los virus de Sarampión o Junín.

Para ello los objetivos específicos consistieron en estudiar los efectos del ATP y otros agonistas de receptores P2 sobre:

- el ciclo celular y la proliferación de osteoblastos
- la diferenciación a osteoblastos maduros, evaluando el grado de mineralización de los cultivos y los cambios en marcadores de diferenciación, como la actividad y expresión de la enzima fosfatasa alcalina, expresión de sialo-proteína ósea, y osteoprotegerina, entre otros
- la expresión de diversas proteínas osteogénicas (BMP-1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7)
- la diferenciación de los osteoblastos y su interacción con la respuesta celular frente a la infección con los virus de Sarampión y Junín
- la participación de la vía PI3K/AKT en la respuesta de los osteoblastos a la estimulación purinérgica y frente a la infección viral.

Metodología

Drogas y reactivos

Los compuestos ATP, ATP γ S, UTP, ADP β S, UDP, rojo de alizarina, Coomassie Brilliant Blue G-250, el medio de cultivo α -MEM (*α -Minimal Essential Medium*), el detergente Tritón X-100 fueron adquiridos en Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). El Ly294002 se obtuvo en EMD Chemicals, Inc (San Diego, USA). El suero fetal bovino (SFB) utilizado se adquirió en Natocor (Córdoba, Argentina). Los cebadores (*primers*) utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (*Real Time Quantitative-PCR*), dirigidos contra secuencias pertenecientes al ARNm (de BMPs u otras proteínas) y el kit para obtención de ADNc (High-Capacity ADNc Reverse Transcription Kit) se obtuvieron en Invitrogen S.A. (Buenos Aires, Argentina). El kit para el aislamiento del ARNm a partir de los cultivos (Quick-RNATM Miniprep), y la mezcla de reacción para RTQ-PCR (KAPPA SYBR[®] FAST qPCR Kit) se adquirieron en Biosystems S.A. (Buenos Aires, Argentina). El resto de los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

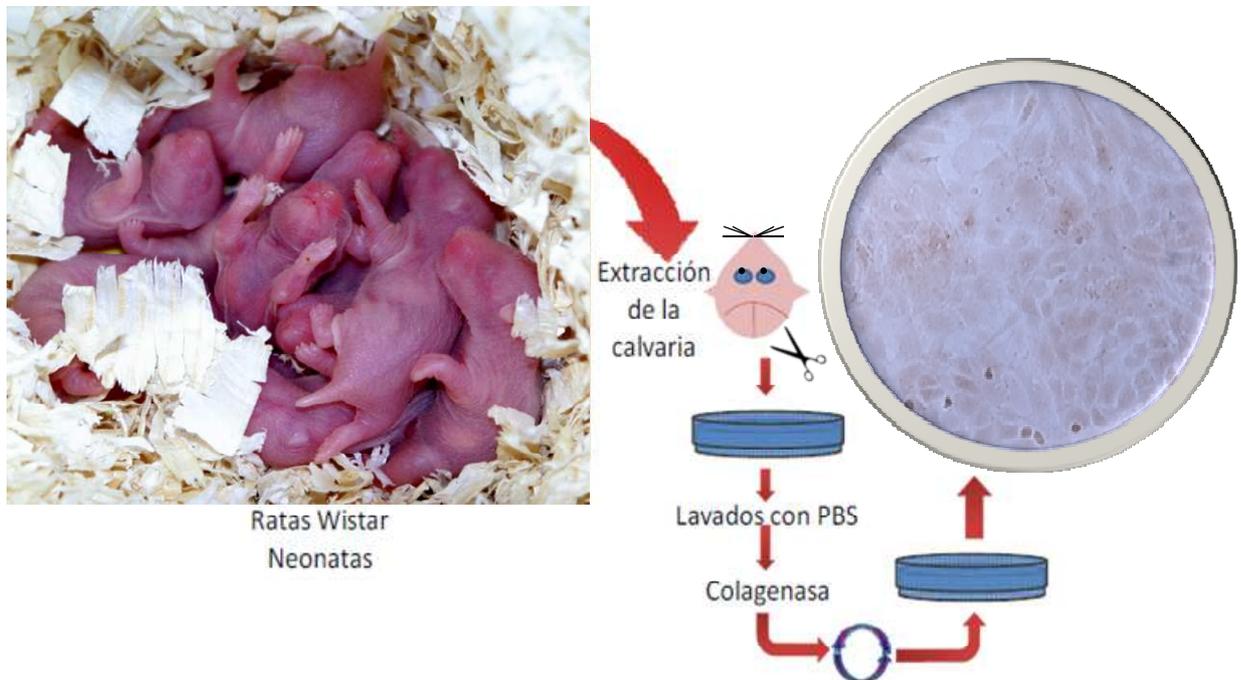
Cabe destacar que se utilizó ATP γ S (análogo no hidrolizable del ATP) y ADP β S (análogo no hidrolizable del ADP) para discriminar la contribución de productos de hidrólisis en las respuestas celulares al ATP y ADP respectivamente.

Obtención de osteoblastos calvariales (OBCs) de rata

Se utilizaron ratas Wistar neonatas (4-5 días) para aislar osteoblastos (Morelli y col., 2011). Los animales fueron decapitados rápidamente, empleando tijeras afiladas y estériles, conforme a *AVMA Guidelines on Euthanasia*, y a *The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health* (NIH Publication Eighth Edition). Luego de la ablación del cráneo se apartó la piel y tejido de la base y se disecó la calvaria, en condiciones asépticas. El tejido óseo se lavó 3 veces con PBS 1X conteniendo EDTA 4 mM, a 37°C durante 10 min. Seguidamente se incubó en una solución salina conteniendo colagenasa 200U/ml, durante 10

min con agitación y a 37°C para permitir la disociación enzimática de las células (este procedimiento se repitió 3-4 veces). Las células liberadas en la primera digestión fueron descartadas y se colectaron aquellas liberadas en las subsecuentes digestiones mediante centrifugación a 1500 rpm durante 10 min (ver figura de esta sección).

Se sembraron aproximadamente 1.000.000-1.500.000 células por cada caja de cultivo de 75 cm² en medio α -MEM suplementado con 15% SFB y 1% antibiótico-antimicótico (GIBCO, Invitrogen). Los OBCs así obtenidos, se cultivaron a 37°C en atmósfera húmeda controlada con 5.5% de CO₂ durante 24 hs. Posteriormente se reemplazó el medio de cultivo por α -MEM suplementado con 10% SFB (1% antibiótico-antimicótico) hasta alcanzar 70-80% de confluencia. Luego se prepararon criotubos con las células resuspendidas en α -MEM 10% SFB con 10% de DMSO y se congelaron a -80°C durante 2 días. Posteriormente se guardaron dichos criotubos bajo atmósfera de nitrógeno hasta su uso.



Representación esquemática simplificada de la obtención de cultivos primarios de osteoblastos de calvaria de rata.

Tratamiento celular

Los OBCs (~ 8500 células/cm²) se cultivaron durante 48 hs (~70-80 % de confluencia) en α -MEM 10% SFB, luego se reemplazó el medio de cultivo por α -MEM 1% SFB. Al cabo de 18 hs, los OBCs se trataron con ATP, ATP γ S, UTP, UDP, ADP o ADP β S a las concentraciones y tiempos indicados en las figuras, tanto en presencia como en ausencia de bloqueadores o inhibidores específicos, o de los virus de Sarampión o Junín, en α -MEM 1% SFB o medio osteogénico (α -MEM 1% SFB conteniendo β -glicerofosfato 2 mM y ácido ascórbico 50 μ g/ml) según se indica. Durante los tratamientos, se renovó el medio (conteniendo los respectivos agonistas, inhibidores, o vehículo) cada 2-3 días.

Virus

Se trabajó con un stock de virus de Sarampión (MEV), cepa Brazil/001/91, gentilmente donada por la Dra. Mónica Wachsmann del Laboratorio de Virología, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, Buenos Aires, Argentina, y con un stock de virus de Junín (JUNV), cepa atenuada XJCI3. La titulación viral se realizó por el método de Unidades Formadoras de Placas (UFP) en células Vero (American Type Culture Collection, ATCC-CCL81). Para ello, estas células se cultivaron en Minimum Eagle's Medium (MEM) con 5 % de suero de ternera (ST) (GIBCO, Invitrogen) y 50 μ g de gentamicina/ml hasta confluencia en microplaca de 24 cavidades. Posteriormente las células se infectaron con diluciones seriadas al décimo del virus a titular por duplicado. Se incubaron los cultivos por 1 hora a 37°C agitando cada 15 min para permitir la adsorción y penetración del virus a las células. Luego se descartó el inoculo y se agregó una mezcla de MEM 3% ST y metilcelulosa 1,4% (en partes iguales). Se incubó el cultivo así infectado a 37°C durante 7 días en atmósfera húmeda controlada con 4% de CO₂. Se

fijaron las células con formol al 10% durante 20 min, se lavó y se tiñó con cristal violeta 1%.

El título se calculó de la siguiente forma:

$$UFP/ml = \frac{\textit{Promedio del número de placas}}{\textit{Volumen del inóculo} \times \textit{Dilución en la cuál se realizó el recuento}}$$

Infección de los OBCs

Los OBCs se infectaron con JUNV a una m.o.i. (del inglés *multiplicity of infection*) de 1 UFP/célula inmediatamente junto al tratamiento. En cambio, en el caso de MEV, la infección se realizó 24 hs previas a la finalización del tratamiento celular, observándose los resultados a distintos tiempos post-infección (p.i.). Algunos cultivos fueron mantenidos en α -MEM 1% SFB o medio osteogénico por más de 25-30 días, con renovación del medio cada dos o tres días.

Inmunocitoquímica y microscopía de fluorescencia convencional.

Las células se sembraron sobre cubreobjetos (contenidos en cámaras especiales para microscopía) y se cultivaron hasta alcanzar un 50-60 % de confluencia. Luego de tres lavados con PBS 1X pH 7.4, los OBCs se fijaron mediante incubación con paraformaldehído al 2% en PBS 1X o glutaraldehído al 1% durante 10 min. Para permeabilizar las células se incluyó 0.05 % Triton X-100 a la solución de paraformaldehído. Alternativamente, se realizó la fijación y permeabilización de las células con metanol, incubando a -20°C durante 20 min. Las células se incubaron luego durante 60 min en presencia o en ausencia (control negativo) de los anticuerpos primarios. Se eliminó el exceso de anticuerpo primario mediante tres lavados con PBS 1X y luego se realizó la incubación con el anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo durante 60 min. Finalmente los preparados se montaron sobre porta-objetos para su visualización por microscopía de fluorescencia convencional.

La expresión de antígenos virales se midió por la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI). Los OBCs se sembraron sobre cubreobjetos en placas de 24 cavidades. Las células se sometieron al tratamiento con los nucleótidos, infectándose al mismo tiempo con JUNV. A distintos tiempos p.i. las células se lavaron con buffer fosfato salino (PBS) y se fijaron con metanol durante 10 min a -20°C . Este paso permeabiliza la membrana plasmática (IFI total). Luego, las células fueron lavadas con PBS 1X y se incubaron con el anticuerpo monoclonal NA05AG12 (anti-N) (1:300) por 45 min a 37°C . Las células se lavaron con PBS 1X y se incubaron con IgG de cabra anti-ratón conjugada con tiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma) (1:50) por 45 min a 37°C . Las células fueron lavadas con PBS 1X luego de la segunda incubación efectuándose un último lavado con agua destilada. Finalmente, el núcleo se tiñó con 0.05% de azul de Evans y los cubreobjetos fueron montados sobre una solución de glicerol al 90% en PBS 1X al 2.5% de 1.4-diazabicyclo (2.2.2) octano (DABCO, Sigma). Las muestras fueron observadas en microscopio de fluorescencia (Olympus BX51), y se tomaron fotografías con el software Image-Pro.

Western blot

Los OBCs de una cavidad de la microplaca se solubilizaron en 25 μl de un buffer de carga compuesto en partes iguales de agua y buffer de siembra para PAGE (BioRad) (0.06 M Tris/HCl pH 6.8, 5% SDS, 10% de glicerina, 2% β -mercapto-etanol, 0.05% azul de bromofenol). Las células lisadas fueron separadas por 10% SDS-PAGE y transferidas a una membrana PVDF (Hybond P, Amersham Pharmacia) en un sistema de transferencia semi-húmedo (LKB Instruments, Multiphor II). La nucleoproteína viral, N, fue revelada con IgG el anticuerpo monoclonal NA05AG12 (anti-N) mAb (1:300) y como anticuerpo secundario se utilizó una IgG anti-ratón conjugada con peroxidasa (ICN Immuno Biologicals) (1:2000), y se reveló su presencia con un sistema de detección de quimioluminiscencia (ECL, Amersham Pharmacia). A las membranas se les realizó una remoción de los anticuerpos unidos con buffer

de stripping (tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, SDS al 2%, β -mercapto-etanol 100 mM) durante 30 min a 55-60°C y posteriores lavados con buffer TBS-Tween 0,1%, con leche descremada 5%. Luego fueron reveladas con un anticuerpo JLA20 anti-actina (1:2000) (Calbiochem). El mAb anti-JUNV mAbs NA05AG12 fue gentilmente provisto por el Dr. A. Sanchez (Center for Disease Control, National Institutes of Health, MD, USA) (Sanchez y col., 1989).

Ensayo de proliferación celular

Se determinó la cantidad de células viables empleando el kit comercial CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega). Las células se sembraron en placas de 96 cavidades, el cultivo y los tratamientos se realizaron como se indicó anteriormente en medio α -MEM con 1% de SFB. Al finalizar cada tratamiento, se reemplazó el medio de cultivo por 100 μ L de una mezcla 1:5 de MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium); buffer de medición (NaCl 138 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM, Hepes pH7 10 mM, glucosa 5 mM, CaCl₂ 1,8 mM). Las células fueron incubadas en oscuridad a 37°C (5.5% CO₂) durante 60 min y posteriormente se midió la absorbancia a 490 nm en espectrofotómetro. Se procesó en paralelo un blanco de reactivos, para lo cual se incubó el mismo volumen de la mezcla 1:5 de MTS en cavidades vacías, y su absorbancia fue sustraída a la de las muestras. Los resultados fueron obtenidos como absorbancia por cavidad y expresados como porcentaje de estimulación respecto al control o en unidades arbitrarias tomando los controles como valores de referencia iguales a 1.

Determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina (FAL)

La actividad de fosfatasa alcalina (FAL) de los lisados celulares fue determinada colorimétricamente usando un kit comercial (Wiener Lab., Rosario, Argentina); en este ensayo se usa fenilfosfato de sodio como sustrato; la enzima en presencia de metil propanolamina (pH 10) libera fenol. Este se

combina con 4-amino-antipirina y ferrocianida que conforman la solución generadora de color y el producto es cuantificado por espectrofotometría a una $\lambda = 520 \text{ nm}$.

Los OBCs se cultivaron en microplacas de 6 cavidades (2×10^5 células/cavidad) en α -MEM suplementado con 10% SFB. Luego se realizaron los tratamientos con los diferentes nucleótidos en medio osteogénico durante los tiempos indicados como se describió anteriormente. Para finalizar el tratamiento, las células fueron lavadas y levantadas mecánicamente en 200 μl de PBS, luego se sonicaron a 4°C y centrifugaron 3 min a 500g. Se colectó el sobrenadante y se guardó a 4°C hasta realizar el ensayo como se indicó arriba. En paralelo, se procesaron el blanco de reactivos (B) y estándares (S) (200 UI/L fenol). Se midió la densidad óptica de las muestras (D) y la actividad FAL se calculó de la siguiente manera: $\text{FAL (UI/L)} = 200 \text{ UI/L} \times (D - B)/(S - B)$.

Valoración de la mineralización ósea

Para evaluar el grado de mineralización en los cultivos, se determinaron cuali y cuantitativamente los depósitos de calcio existentes luego de los distintos tratamientos en medio osteogénico como se describió anteriormente. Esto se realizó mediante la tinción con un colorante de origen vegetal, llamado rojo de alizarina (al 2% en agua pH 4), el cual forma complejos insolubles con el calcio iónico.

Determinación cuantitativa de depósitos de calcio: Luego de los tratamientos específicos, los cultivos celulares se lavaron con PBS 1X pH 7.4 seguido de fijación con glutaraldehído al 1% durante 10 minutos. A continuación, las células se lavaron con agua destilada y posteriormente se incubaron con rojo de alizarina al 2% durante 30 min a 37°C. Inmediatamente después de lavar los preparados con agua destilada, se tomaron fotos de la coloración. Posteriormente se solubilizaron las muestras con NaOH 0.1N y se midió la D.O. a 548 nm en espectrofotómetro. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias, tomando los valores de D.O. al inicio del tratamiento como valores de referencia iguales a 1.

Determinación cualitativa de depósitos de calcio: Se siguió el mismo procedimiento anterior, con la diferencia que se emplearon células crecidas sobre cubreobjetos de vidrio. Una vez finalizada la tinción, los preparados se montaron sobre portaobjetos. Las muestras se observaron en un microscopio Nikon Eclipse TE 300 con objetivo de 40x y se fotografiaron con cámara Nikon Digital Sight DS U2. Las imágenes fueron analizadas con el programa ImageJ (NIH).

Cuantificación de proteínas

Las células provenientes de los cultivos de los OBCs se extrajeron mecánicamente con un buffer de lisis (Laemmli Sample buffer de BioRad tris-HCl 31.5 mM pH 6.8, glicerol al 10%, SDS al 1%, bromophenol blue 0.005%, β -mercapto-etanol 355 mM), posteriormente se tomaron alícuotas por duplicado de las muestras y se las incubó durante 5 min en presencia de 2,5 mL de reactivo de Bradford (Coomassie Brilliant Blue G-250 100 mg/L, etanol al 4,75% y ácido fosfórico al 8,5%) (Bradford, 1976). Como estándar de concentración conocida se empleó 1mg/mL de albúmina sérica bovina (BSA). Las absorbancias se midieron a 595 nm empleando un espectrofotómetro Beckman DU530.

Estudio de ciclo celular por citometría de flujo

Luego de los tratamientos específicos, las células se lavaron con PBS 1X dos veces y se levantaron con tripsina evitando la formación de grumos. Se frenó la acción de la tripsina con el agregado de α -MEM 10% SFB seguido de centrifugación a 1200 g durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en PBS 1X y se colectaron por centrifugación. Cada muestra se resuspendió nuevamente en PBS 1X y se agregó suavemente etanol 96°, con agitación continua y suave de la suspensión celular, hasta llegar a una concentración final de etanol del 70%. Posteriormente se colocaron

las muestras a -20°C durante una hora. Luego se dejó que la muestra alcance la temperatura ambiente, se centrifugó, se lavó con PBS 1X como se indicó anteriormente, y se resuspendió en 300-500 μL del Kit FACS (BD PHARMIGEN™) que contiene ioduro de propidio y ribonucleasas.

El análisis por citometría de flujo se realizó en el equipo BD FACSCalibur, con el programa de captura y análisis de datos CellQuest ProV 6.0.

Obtención del ADNc

La extracción del ARN de los cultivos celulares se realizó con el kit comercial “Quick-RNA™ Miniprep”, siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. Tanto la concentración del ARN como la calidad o pureza del mismo se determinaron de manera espectrofotométrica (Concentración, Absorbancia₂₆₀; Pureza, Absorbancia₂₆₀/Absorbancia₂₈₀ entre 1.8 y 2). Las cadenas de ADNc se sintetizaron a partir de RNA total, usando el kit comercial “High-Capacity ADNc Reverse Transcription” (Applied Biosystems), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

PCR cuantitativa en tiempo real (QRT-PCR)

El ADNc obtenido en los pasos anteriores se utilizó para evaluar, mediante *Quantitative Real Time* – PCR, los niveles de expresión de las diferentes proteínas estudiadas, así como los cambios producidos luego de los tratamientos específicos. Se realizaron estos estudios siguiendo el protocolo de Invitrogen con el reactivo SYBR Green I (Deschaght y col., 2009).

La QRT-PCR fue realizada en un equipo 7500-Real-Time PCR Systems” (Applied Biosystems), y las corridas se realizaron respetando los siguientes patrones:

- para la obtención de las curvas estándar: 1 ciclo para la activación de la enzima a 95°C 3 min, seguido de 50 ciclos de 95°C 3 seg para la desnaturalización, y apareamiento/extensión a 60°C durante 30 seg. Las

curvas de melting se obtuvieron con 95°C 15 seg., 60°C 1 min., 95°C 30 seg., 60°C 15 seg.

- para la determinación del ΔCT (cuantificación del nivel de expresión génica): 1 ciclo para la activación de la enzima a 95°C 3 min, luego 40 ciclos de 95°C 3 seg para la desnaturalización, y apareamiento/ extensión a 60°C durante 30 seg. Las curvas de melting se obtuvieron con 95°C 15 seg., 60°C 1 min., 95°C 30 seg., 60°C 15 seg.

Los niveles de expresión de los genes en estudio fueron normalizados respecto a los niveles de gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa (GAPDH).

Todos los cebadores usados se describen en la Tabla 1.

	Cebador Directo	Cebador Reverso
Col 1 $\alpha 1$	5' CCCTACCCAGCACCTTCAAA 3'	5' ATGGAGATGCCAGATGGT 3'
Col 1 $\alpha 2$	5' ACCCAGAGTGGAAGAGCGATTA 3'	5' GCATCCATAGTGCATCCT 3'
FAL	5' AGAACTACATCCCCCACG 3'	5' CAGGCACAGTGGTCAAGGT 3'
GAPDH	5' GGCAAGTTCAACGGCACAGT 3'	5' TGGTGAAGACGCCAGTAGACTC 3'
OPG	5' AGCTGGCACACGAGTGATGAA 3'	5' CACATTCGCACACTCGGTTGT 3'
BSP	5' TCCCCACCAGCCAGAAAAG 3'	5' TCGTTGCCTATTTGTTCGTATTCTT 3'
rBMP-1	5' CCCCCACCCAGTACCGTATC 3'	5' ATCATTGCCCTCAGTCTCGAA 3'
rBMP-2	5' GGCCACGACGGTAAAGGA 3'	5' GCTTCCGCTGTTTGTGTTTG 3'
rBMP-3	5' GGACCCTCCAATCCAACCA 3'	5' AGGTTTGGCCGTATCTACTGACA 3'
rBMP-4	5' CCAAGCGTAGTCCCAAGCAT 3'	5' CGACGGCAGTTCTTATTCTTCTTC 3'
rBMP-5	5' TCCCTTTGATGGCGTTGGT 3'	5' AATCTGCCGGTCAGAAGCAA 3'
rBMP-6	5' CGCTCCGCTCTTCATGCT 3'	5' TGACACCCCATCCTCTTCGT 3'
rBMP-7	5' CCGCTCCAAGACTCCAAAGA 3'	5' GCTGCTGTTTTCTGCCCACT 3'

Tabla 1. Secuencias de los cebadores empleados para QRT-PCR. OPG: Osteoprotegerina, Col 1 $\alpha 1$: Colágeno tipo 1 $\alpha 1$, Col 1 $\alpha 2$: Colágeno tipo 1 $\alpha 2$, FAL: Fosfatasa alcalina, BSP: Sialo-proteína ósea y rBMPs (proteínas formadoras de hueso de rata).

Análisis estadístico

La significancia estadística de los datos se evaluó por medio del test t de Student (Snedecor y Cochran, 1967). Se consideraron significativos los

resultados con valores de probabilidad por debajo de 0,05 ($p < 0,05$). Los datos cuantitativos se expresan como el promedio \pm desvío estándar (DE) de la serie de experimentos indicados.

Resultados y discusión

I- Optimización de siembra y condiciones de cultivo de osteoblastos de calvaria de rata

En primer lugar se optimizaron las condiciones y densidad de siembra para los cultivos primarios de osteoblastos de calvaria de rata (OBCs) utilizados en esta Tesis a fin de estandarizar las condiciones de utilización de dichas células en todos los experimentos.

I-1- Densidad de siembra

Las células se descongelaron, se sembraron en microplacas de 96 cavidades a diferentes densidades (500, 1000, 2000, 2500, 3000, 4000 células/cavidad) y se cultivaron durante dos días en α -MEM 10% SFB como se indica en la Metodología. Transcurrido este tiempo se continuó el cultivo en medio α -MEM 1% SFB. Los cultivos se observaron a las 24 hs por microscopía para evaluar adherencia y morfología celular, y a las 48 hs se realizó el ensayo de MTS, para evaluar la viabilidad celular, tal cual se describe en la Metodología (Fig. 1). La densidad de siembra considerada óptima fue aquella en la que los cultivos no se vieron afectados morfológicamente, ya sea por inhibición de crecimiento por contacto debida a la falta de espacio (como se observó en los cultivos sembrados a una densidad de 4000 células/cavidad equivalente a 20000 células/cm²), o por demasiada superficie libre entre las células (cultivos sembrados a una densidad menor de 1000 células/cavidad o 5000 células/cm², en los que se observó un alargamiento en la morfología celular). Además, como se observa en la Fig. 1, los resultados obtenidos mediante el ensayo de MTS mostraron que la densidad de siembra debe aproximarse a 2000 células/cavidad para obtener, en condiciones basales, lecturas de D.O=0,340±0,050 que caen en un punto intermedio del rango de detección del ensayo (D.O=0,200-0,900), aumentando la posibilidad de detección de cambios en la viabilidad celular por acción de los agonistas. Por ello, se consideró que densidades de siembra comprendidas entre 1500 y 2000 células/cavidad equivalentes a 7500 y 10000 células/cm² respectivamente, serían las óptimas para los estudios realizados en esta Tesis. En todas las

concentraciones ensayadas se comprobó una correlación lineal entre la cantidad de células sembradas y la densidad óptica medida.

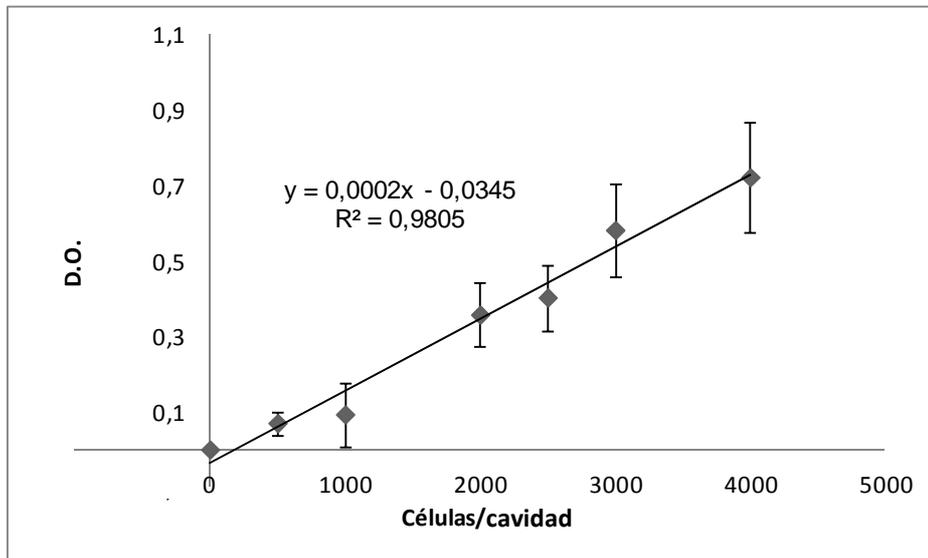


Figura 1. Determinación de la viabilidad celular en función de la densidad de siembra. Los OBCs fueron sembrados a distintas densidades (500-4000 células/cavidad) en microplacas de 96 cavidades y se cultivaron durante 48 hs en medio α -MEM 10% SFB seguido de otras 48 hs de incubación en medio α -MEM 1% SFB. Al final del periodo de incubación se realizó el ensayo de MTS y se determinó la absorbancia de cada muestra, tal cual se describe en la Metodología. Cada punto en la gráfica corresponde al promedio \pm DE de dos experimentos realizados por cuatuplicado. El coeficiente de correlación lineal fue de 0.9805, indicando una relación directamente proporcional entre el número de células y la absorbancia.

I-2- Privación de suero

Dado que los experimentos que se planearon para esta Tesis incluían tiempos de incubación de hasta 22 días con diversos agonistas y de hasta 70 días con virus, fue necesario conocer si los cultivos primarios resistirían tiempos tan prolongados sin suero. Por ello, se evaluó cuál era la mínima cantidad de suero necesaria para mantener la viabilidad de los cultivos durante los tratamientos. Con este fin, las células se cultivaron durante 48 hs con α -

MEM 10% SFB como se indica en la Metodología, luego se reemplazó este medio por α -MEM sin SFB, α -MEM 0,5% SFB o α -MEM 1% SFB, y se las continuó incubando en las mismas condiciones por distintos tiempos, renovando el medio cada 2-3 días. Se realizaron observaciones de la monocapa y morfología celular, bajo microscopio óptico cada 24 hs.

Se observó que las células completamente privadas de suero (α -MEM sin SFB) a las 48 hs comenzaron a presentar vacuolas en su citoplasma y a perder adherencia, notándose un levantamiento de la monocapa celular alrededor de las 72 hs. Por otro lado, a las 96 hs se pudieron apreciar cambios morfológicos similares a los anteriores en las células incubadas con α -MEM 0,5% SFB. Contrariamente, las células incubadas con α -MEM 1% SFB no presentaron tales cambios y se mantuvieron viables durante 22 días. Por ello, se eligió esta última condición para los tratamientos celulares puesto que permite realizar experimentos a largo plazo, sin mostrar cambios significativos en la viabilidad celular. En adelante, las incubaciones con α -MEM 1% SFB se denominarán condiciones de “privación de suero”.

I-3- Arresto del ciclo celular bajo privación de suero

Con el fin de favorecer la detección de cambios inducidos por los distintos tratamientos en las fases del ciclo celular, se evaluó el tiempo de incubación necesario para arrestar el ciclo celular y sincronizar los cultivos antes del inicio de dichos tratamientos bajo privación de suero. Para ello los OBCs se incubaron en α -MEM 1% SFB durante los tiempos indicados y luego se realizó la citometría de flujo como se indica en la Metodología.

Como se puede observar en la Fig. 2, a partir de las 7 hs de incubación en condiciones de privación de suero, los OBCs lograron ser arrestados en la fase G_0/G_1 del ciclo celular. Esto se evidencia claramente en la tabla 1, que muestra la proporción de los OBCs (expresada en %) que se encuentra en cada fase del ciclo celular luego de distintos tiempos de incubación bajo privación de suero. Puede notarse que alrededor del 90% de la población celular se mostró arrestada en la fase G_0/G_1 del ciclo en todos los tiempos estudiados, sin

observarse cambios significativos entre ellos. Sobre la base de estos resultados, se decidió arrestar las células durante 7-18 hs y no tiempos mayores a estos para evitar un estrés innecesario previo a los tratamientos.

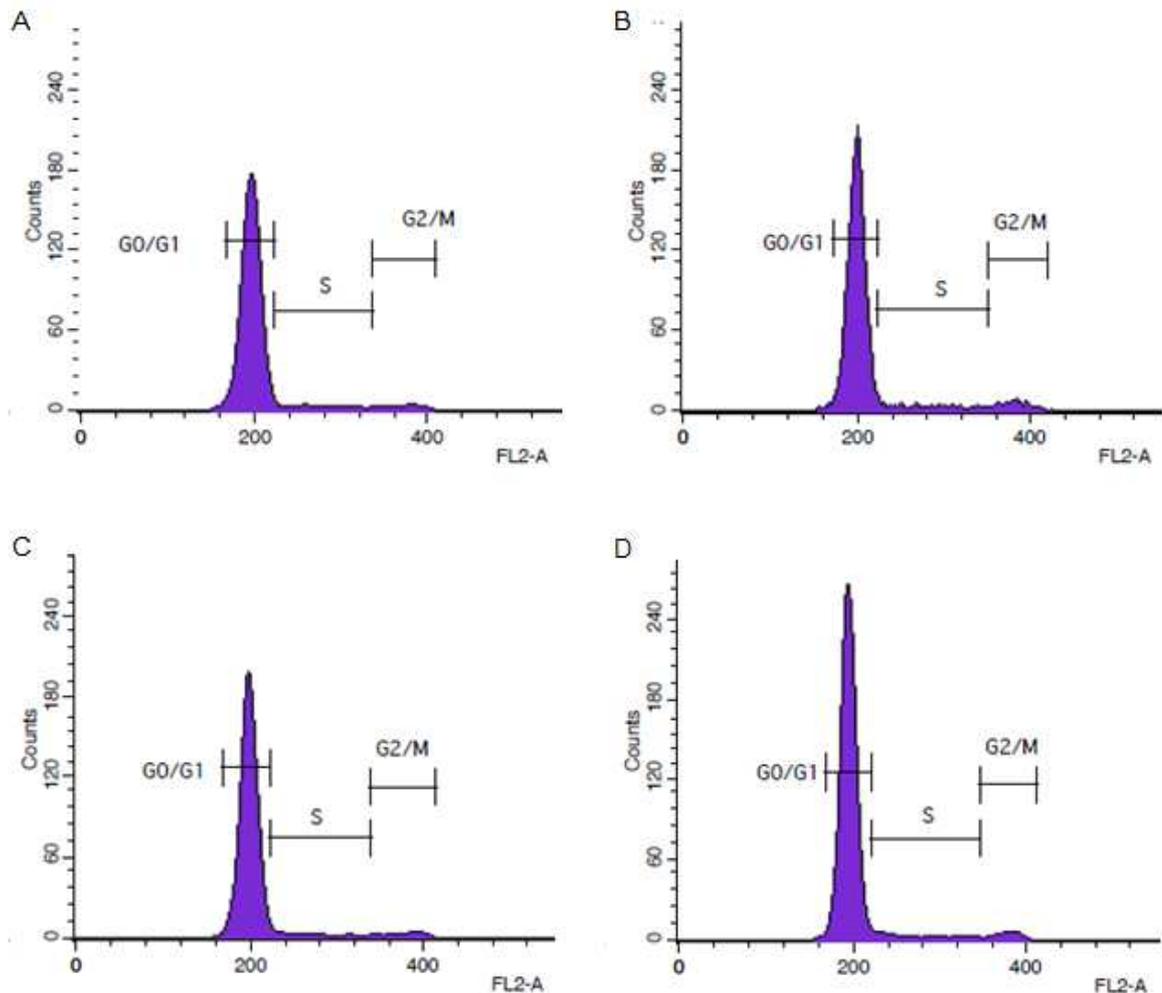


Figura 2. Arresto del ciclo celular y sincronización de cultivos de OBCs en condiciones de privación de suero determinado por citometría de flujo. Las células se cultivaron durante 48 hs en medio α -MEM 10% SFB, luego se reemplazó el medio por α -MEM 1% SFB y se incubaron durante A) 7, B) 18, C) 24, y D) 29 hs. A continuación, fueron procesadas como se detalla en la Metodología para citometría de flujo. Los histogramas representan la cantidad de células (*Counts*) en función de su intensidad de fluorescencia (FL2-A). Los gráficos pertenecen a un experimento representativo de tres experimentos individuales.

Fases de ciclo celular	Tiempo de incubación			
	7 hs	18 hs	24 hs	29 hs
G ₀ /G ₁	90,01±1,51	92,18±1,23	90,64±1,31	91,06±1,01
S	5,44±1,12	4,73±1,29	5,67±0,94	5,66±1,28
G ₂ /M	3,77±0,92	3,19±1,10	3,69±1,01	3,38±1,02

Tabla 1. Ciclo celular de los OBCs en condiciones de privación de suero. Los OBCs fueron cultivados durante 48 hs en medio α -MEM 10% SFB y posteriormente incubados en α -MEM 1% SFB durante los tiempos indicados. Seguidamente, fueron procesados como se indica en la Metodología para citometría de flujo. Los datos se encuentran expresados como % de la población celular en cada fase del ciclo y pertenecen a tres experimentos individuales e independientes. Se muestran valores promedios \pm DE. $p > 0,05$ en todos los casos.

II- Rol del ATP y UTP sobre la proliferación de los OBCs

Se sabe que el ATP genera importantes efectos mitogénicos sobre diferentes tipos celulares, incluyendo a los osteoblastos (Costessi y col., 2005; Alvarenga y col., 2010; Katz y col., 2011). Para verificar este efecto en los OBCs, se evaluaron las condiciones óptimas de tratamiento (tiempo y concentración) con ATP o UTP para estimular la proliferación celular. Para ello se realizó el ensayo MTS tal cual se describe en la Metodología, en los OBCs tratados con ATP, UTP o vehículo durante distintos tiempos y a las concentraciones indicadas en las figuras.

II-1- Tratamiento con ATP

Como se observa en la Fig. 3, el ATP a concentraciones de 10 y 50 μ M estimuló la proliferación celular a las 24, 48 y 72 hs de tratamiento, en tanto

que a concentraciones y tiempos de tratamiento mayores los cambios no fueron significativos.

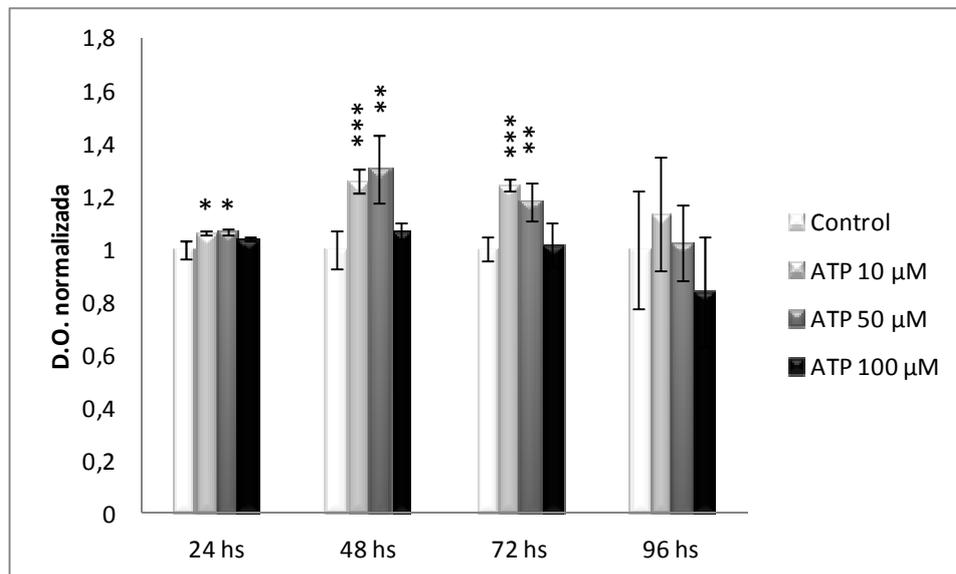


Figura 3. Determinación del efecto del ATP sobre la proliferación de los OBCs.

Las células fueron incubadas con ATP o vehículo a las concentraciones y tiempos indicados. A continuación se determinó la cantidad de células viables mediante ensayo de MTS según se describe en la Metodología. Los resultados están expresados en unidades arbitrarias tomando los controles como valor de referencia igual a 1 (promedio \pm DE) y pertenecen a dos experimentos individuales realizados por cuatriplicado. * $p < 0.02$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs control.

II-2- Tratamiento con UTP

Por otro lado, el UTP mostró un comportamiento parcialmente diferente, al del observado con ATP, puesto que estimuló la proliferación celular a las 24 y 48 hs de tratamiento a todas las concentraciones estudiadas, incluso a una concentración de 100 μ M en la que mostró el mayor estímulo a las 48 hs de tratamiento (Fig. 4), mientras que después de las 72 hs estos efectos fueron menos importantes.

Además, cuando se compararon los efectos del ATP y UTP 10 μ M entre 24 y 72 hs de tratamiento se observó que fueron similares, notándose incrementos

de ~ 30% en la cantidad de células viables entre las 48-72 hs de tratamiento respecto a los controles (Fig. 5).

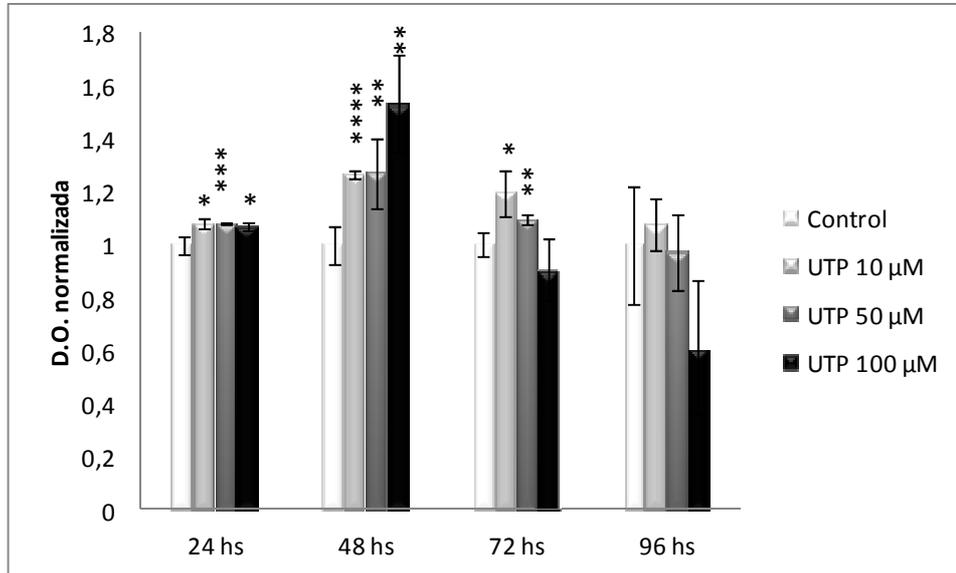


Figura 4. Determinación del efecto del UTP sobre la proliferación de los OBCs.

Las células fueron incubadas con UTP o vehículo a las concentraciones y tiempos indicados. A continuación se determinó la cantidad de células viables mediante ensayo de MTS según se describe en la Metodología. Los resultados están expresados en unidades arbitrarias tomando los controles como valor de referencia igual a 1 (promedio ± DE) y pertenecen a dos experimentos individuales realizados por cuatriplicado. *p < 0.01, **p < 0.02, ***p < 0.005, ****p < 0,001 vs control.

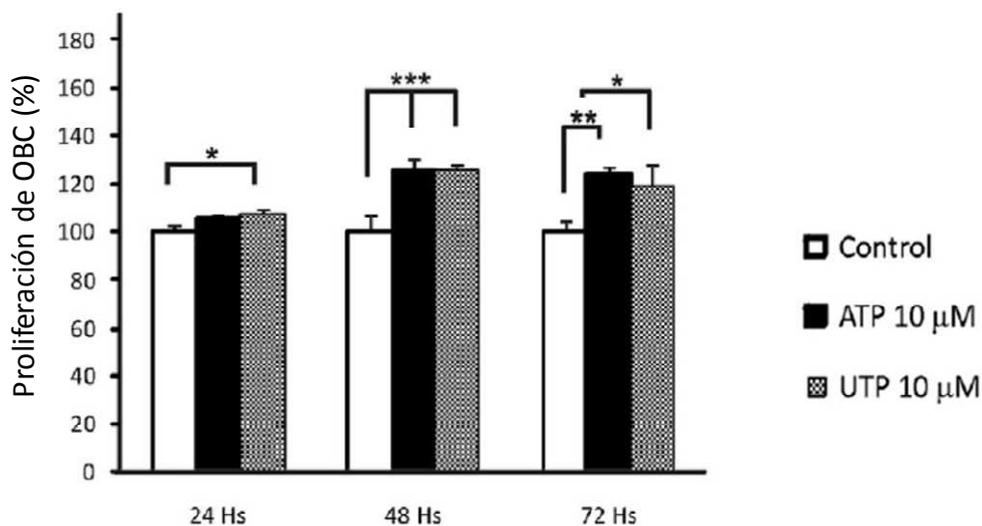


Figura 5. Comparación de los efectos del ATP y UTP sobre la proliferación de los OBCs. Las células se incubaron con ATP, UTP o vehículo a las concentraciones y tiempos indicados. A continuación se determinó la cantidad de células viables mediante ensayo de MTS según se describe en la Metodología. Los resultados están expresados como porcentajes de estimulación respecto a los controles de cada día en estudio (promedio \pm DE) y pertenecen a dos experimentos individuales realizados por cuatriplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.02$, *** $p < 0.001$ vs control.

En base a los resultados obtenidos se decidió elegir como condiciones óptimas para estudiar este efecto 48 hs de tratamiento con ATP o UTP 10 μ M.

III- Rol de la vía PI3K/AKT en la estimulación de la proliferación de los OBCs por el ATP y UTP

Datos recientes han demostrado que los nucleótidos ATP y UTP estimulan la proliferación de células ROS17/2.8 (células osteoblásticas derivadas de osteosarcoma de rata) a través de la vía PI3K/AKT (Katz y col., 2011). Para estudiar si en los cultivos primarios de rata, también participa la vía PI3K/AKT en el efecto del ATP y UTP sobre la proliferación celular, los OBCs fueron incubados en α -MEM 1% SFB en presencia o ausencia de Ly294002 (un inhibidor de PI3K) 10 μ M, seguidos de tratamiento con ATP, UTP 10 μ M o vehículo durante 24, 48, y 72 hs. Subsecuentemente, la cantidad de células viables fue medida por el ensayo MTS tal cual se describe en la Metodología.

Como se observa en la Fig. 6, la proliferación celular resultó inhibida en presencia de Ly294002, sugiriendo que la vía PI3K/AKT se encuentra involucrada en los efectos proliferativos ejercidos por los agonistas purinérgicos ATP y UTP en osteoblastos de rata y validando los datos previamente observados en la línea celular ROS17/2.8 (Katz y col., 2011).

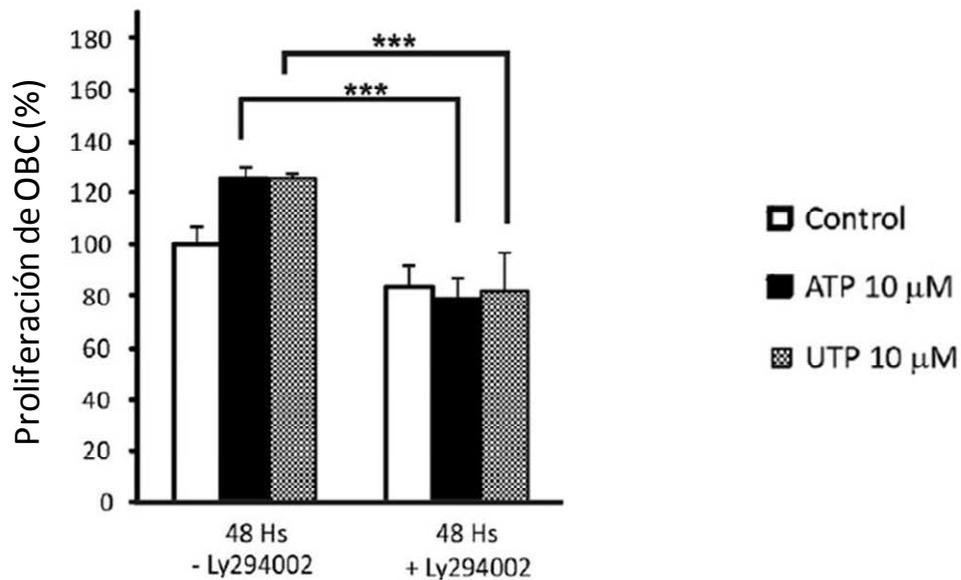


Figura 6. Participación de la vía PI3K/AKT en la proliferación de los OBCs inducida por el ATP y UTP. Las células fueron incubadas con ATP, UTP 10 μ M o vehículo por 48 hs en presencia o ausencia de Ly294002 10 μ M. A continuación, se determinó la cantidad de células viables mediante ensayo de MTS según se describe en la Metodología. Los resultados se encuentran expresados como porcentajes de estimulación respecto a los controles en ausencia de inhibidor (promedio \pm DE) y pertenecen a dos experimentos individuales realizados por cuatuplicado. *** $p < 0.001$ vs control.

IV- Efecto del ATP sobre el ciclo celular de los OBCs

Para profundizar el estudio del efecto del ATP sobre la proliferación celular, se analizó mediante citometría de flujo, el ciclo celular de los OBCs luego de distintos tiempos de tratamiento con ATP. Se procedió a analizar principalmente los efectos sobre la fase S del ciclo, indicativa de actividad proliferativa. Para ello las células, arrestadas durante 7-18 hs, se trataron con α -MEM conteniendo: ATP γ S (análogo no hidrolizable del ATP) 10 μ M, 10% SFB (como control positivo inductor de mitogénesis) o vehículo (control) durante 14, 16 y 18 hs.

En la Fig. 7A se muestra la proporción de células en cada estadio del ciclo celular de los OBCs controles y tratados con 10% SFB durante distintos tiempos. Como se observa en la Fig. 7B, a todos los tiempos estudiados el tratamiento con 10% SFB produjo un efecto positivo sobre la proliferación celular, mostrando incrementos significativos en la proporción de osteoblastos en fase S respecto a los controles. El máximo estímulo se detectó luego de 16 hs de tratamiento con 10% SFB, con incrementos en un orden de 2.7 veces respecto a las células controles.

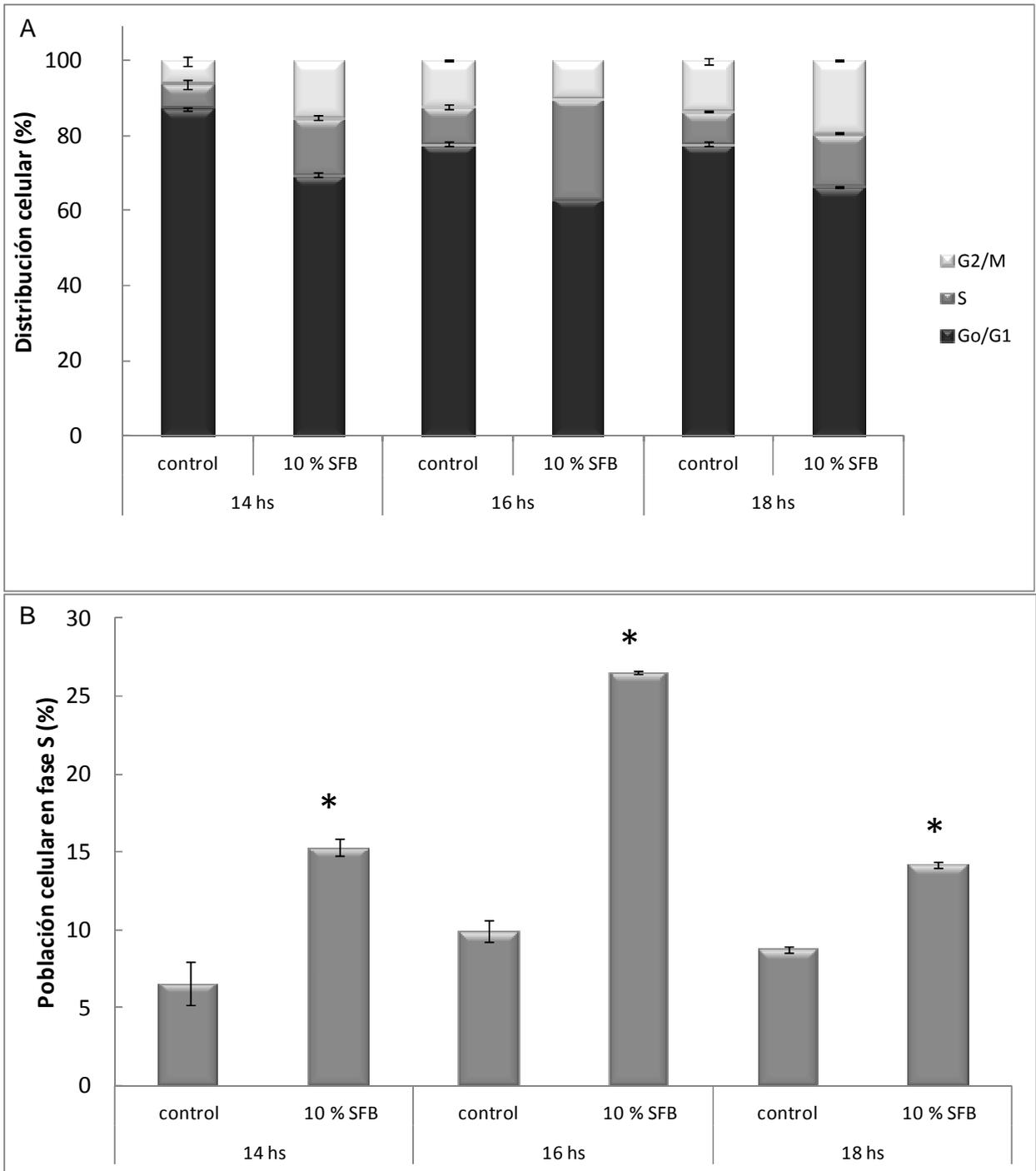


Figura 7. Activación del ciclo celular de los OBCs inducida por SFB. Las células arrestadas durante 7-18 hs se trataron con 10% SFB o vehículo (control) durante los tiempos indicados. A continuación se procesaron para realizar la citometría de flujo como se describe en la Metodología. A) Porcentaje de la población celular en cada estadio del ciclo (G_0/G_1 , S, y G_2/M). B) Porcentaje celular correspondiente solamente a la fase S del ciclo. Los gráficos de barras representan el promedio \pm DE de dos experimentos realizados por triplicado. * $p < 0.001$ vs control.

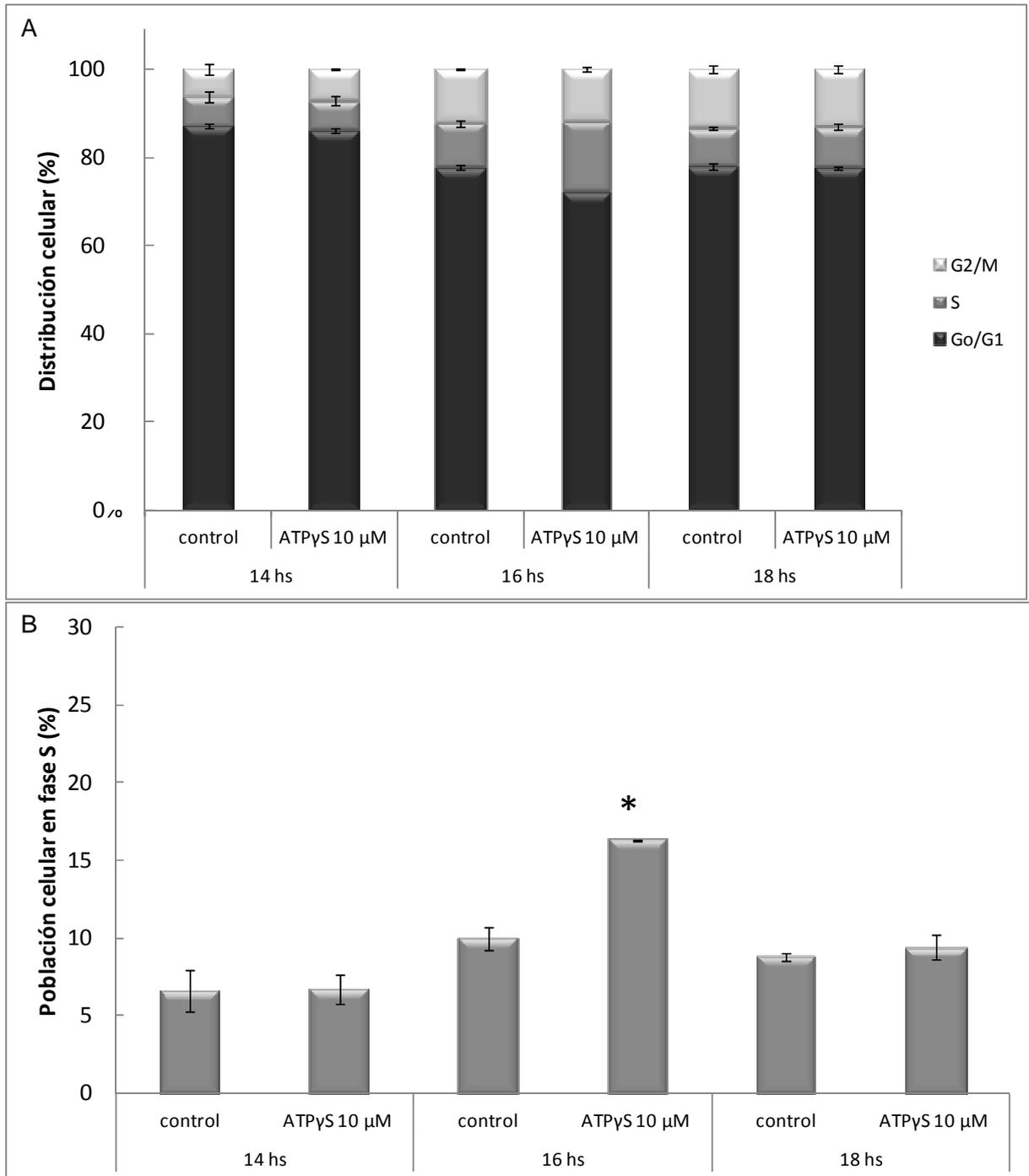


Figura 8. Activación del ciclo celular de los OBCs inducida por ATPγS. Las células se arretaron durante 7-18 hs y luego se trataron con ATPγS 10 μM o vehículo (control) durante los tiempos indicados. A continuación se procesaron para realizar la citometría de flujo como se describe en la Metodología. A) Porcentaje de la población celular en cada estadio del ciclo (G₀/G₁, S, y G₂/M). B) Porcentaje celular correspondiente solamente a la fase S del ciclo. Los datos obtenidos pertenecen al promedio ± DE de dos experimentos independientes realizados por duplicado, *p < 0.001 vs control.

Como se observa en la Fig. 8A las células tratadas con ATP γ S 10 μ M presentaron un incremento de la proporción celular en fase S del ciclo a las 16 hs de tratamiento, observándose aumentos estadísticamente significativos en un orden de 1.7 veces respecto del control (Fig. 8B), mientras que a las 14 y 18 hs de tratamiento no se observaron cambios significativos.

En la Fig. 9 se puede notar más detalladamente lo ocurrido luego del tratamiento de los OBCs con ATP 10 μ M durante 16 hs, tiempo de incubación considerado óptimo para detectar incrementos de la población celular en fase S. Las condiciones con ATP mostraron valores de hasta un 30% aproximadamente del total de la población de los OBCs en fase S-G₂M, aportando la fase S un 17% aproximadamente a este pool celular (Fig. 9C). En cambio, en las condiciones controles, se obtuvo alrededor de un 22% de la población celular en fase S-G₂M, de los cuales la fase S contribuyó con un 10% aproximadamente (Fig. 9B). En los controles positivos (10% SFB) aproximadamente un 37% del total de la población celular se localizó en las fases S-G₂M aportando la fase S un 26% aproximadamente a este pool celular (Fig. 9A). Estos resultados permiten concluir que coincidentemente a lo observado en los controles positivos, el tratamiento con ATP estimula el progreso de la fase G₀ a S del ciclo celular en los OBCs.

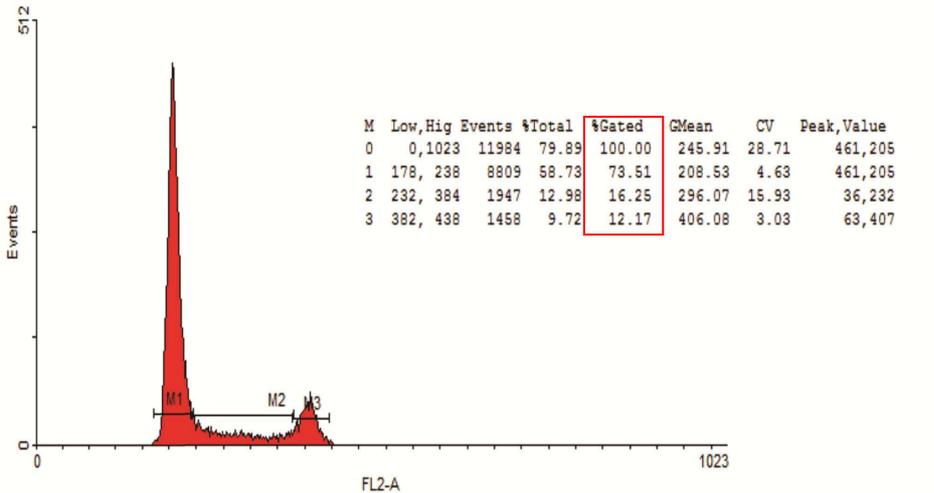
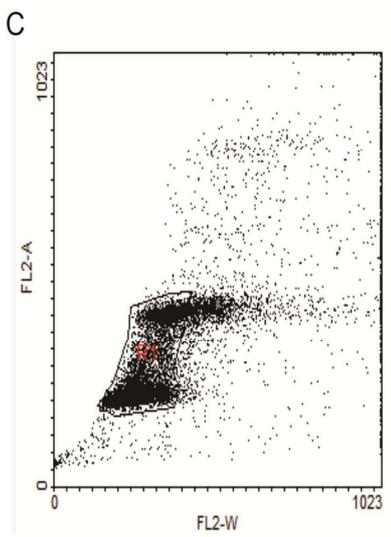
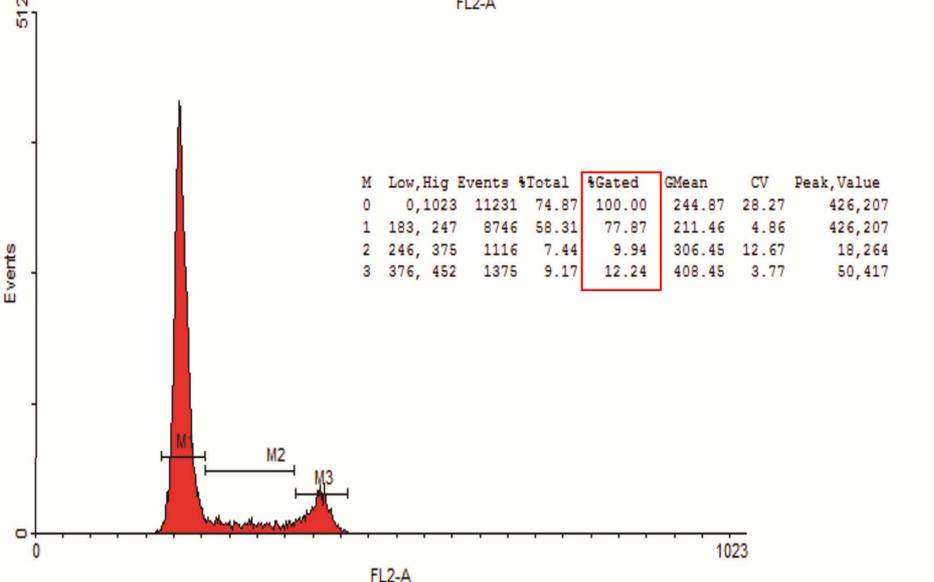
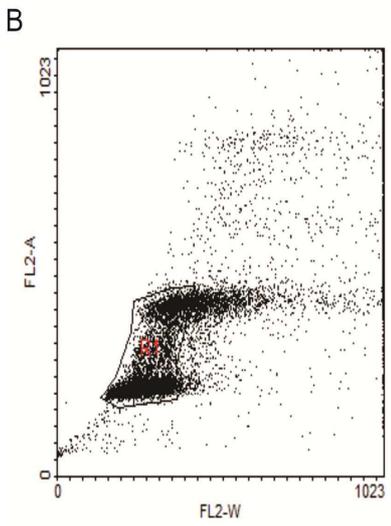
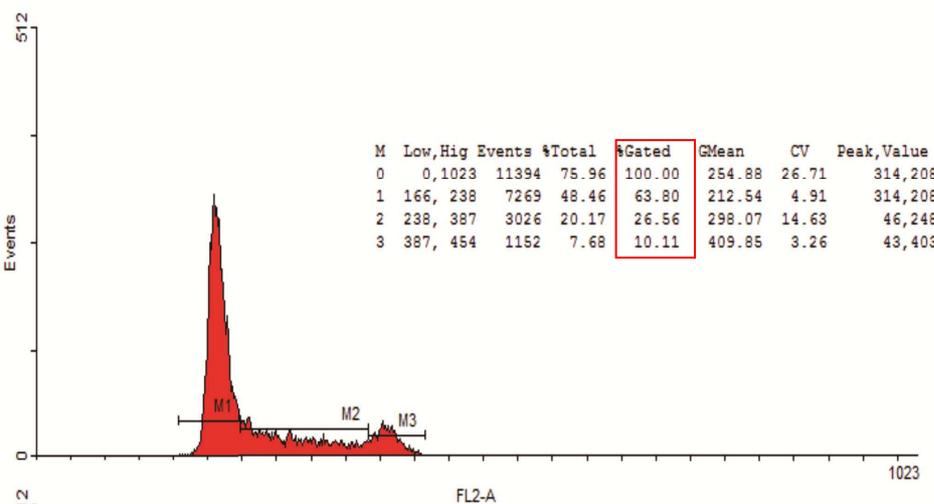
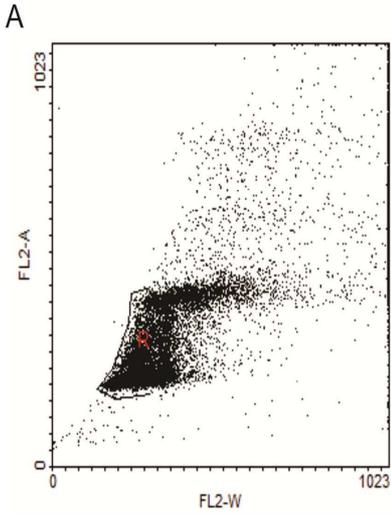


Figura 9. Activación del ciclo celular inducida por el ATP en los OBCs. Las células privadas de suero durante 7-18 hs fueron tratadas con 10% SFB (A), vehículo (B) o ATP 10 μ M (C) durante 16 hs. A continuación, se procesaron para realizar la citometría de flujo como se describe en la Metodología. M1, M2, y M3 corresponden a G₀/G₁, S, y G₂M respectivamente. Los gráficos de puntos de la izquierda representan la distribución de la población de los OBCs en función de la complejidad citoplasmática versus el tamaño celular. Las tablas de la derecha resumen los datos obtenidos de los gráficos de puntos y los histogramas. La figura muestra un experimento representativo de tres experimentos realizados en forma individual e independiente.

V- Efecto de la estimulación purinérgica sobre la diferenciación celular

La enzima fosfatasa alcalina (FAL) es un indicador temprano de la diferenciación de los osteoblastos. En los experimentos que se explican a continuación se usaron diversos nucleótidos para evaluar farmacológicamente el posible rol de los diferentes subtipos de receptores purinérgicos sobre la diferenciación de los osteoblastos. Para ello, los OBCs fueron incubados en el medio privado de suero durante 18 hs, y después fueron tratados con ATP, ATP γ S, UTP, ADP, ADP β S o UDP en un medio osteogénico para acelerar los procesos de diferenciación de los osteoblastos. En el caso de esta Tesis, se empleó un medio base de α -MEM 1% SFB, al cual se le adicionó ácido ascórbico y β -glicerofosfato en las concentraciones indicadas en la Metodología.

Inicialmente, los OBCs se trataron con los distintos agonistas a una concentración de 10 μ M durante diferentes tiempos en medio osteogénico. Subsecuentemente se determinó la actividad de FAL como se describe en la Metodología.

V-1- Modulación de la actividad de FAL por ATP

Como se observa en la Fig. 10, la incubación de los OBCs en un medio osteogénico (condición control) indujo un aumento en la actividad de FAL. Este

aumento es significativamente notable luego de 4 días de incubación, alcanzando su máximo a los 7 días y manteniéndose en valores aproximadamente constantes, aunque por debajo del máximo, entre los días 10 y 14. Bajo las mismas condiciones, el tratamiento de los OBCs con ATP 10 μ M incrementó la actividad de FAL significativamente por encima de los controles al día 4, alcanzando el máximo estímulo al día 7 sin observarse cambios a los 10 y 14 días de tratamiento respecto a los controles.

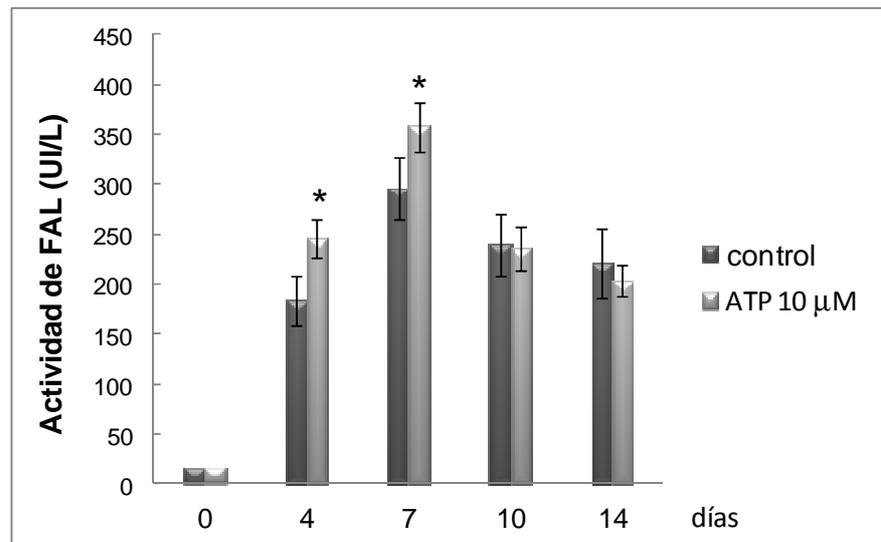


Figura 10. Determinación de la actividad de FAL en los OBCs estimulados con ATP. Las células se incubaron con ATP 10 μ M o vehículo (control) en medio osteogénico, durante los tiempos indicados. Luego, se determinó la actividad de FAL colorimétricamente, como se indica en la Metodología. La gráfica muestra valores (UI/L) obtenidos de calcular el promedio \pm DE de 4 experimentos independientes realizados por triplicado.*p <0.001 vs control.

V-2- Modulación de la actividad de FAL por UTP

En la Fig. 11, se observa que el tratamiento de los OBCs con UTP 10 μ M en medio osteogénico durante 7 y 10 días incrementó la actividad de FAL de manera significativa con respecto a la condición control, siendo máximo este efecto a los 7 días, mientras que a los 14 días de tratamiento la actividad de la enzima no mostró cambios significativos respecto al control.

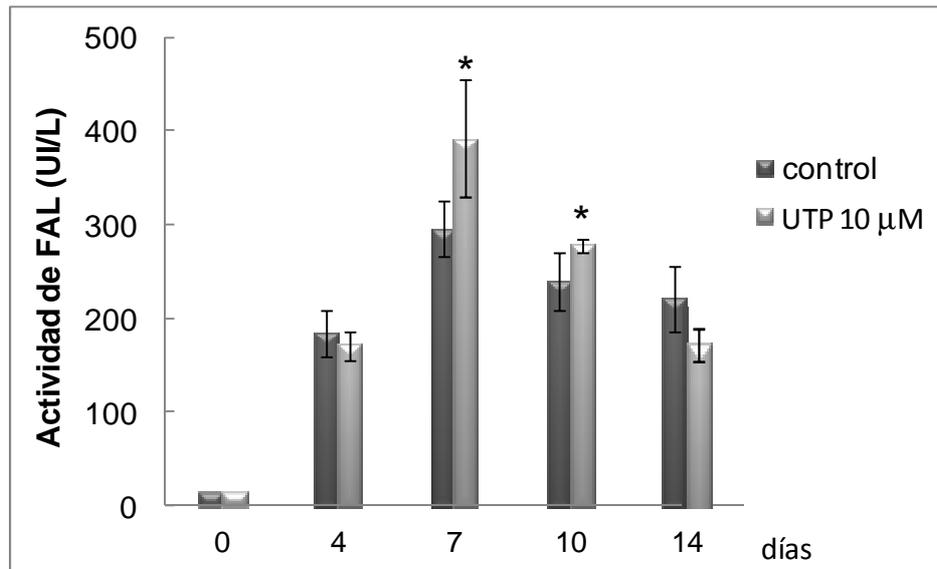


Figura 11. Determinación de la actividad de FAL en los OBCs estimulados con UTP. Las células se incubaron con UTP 10 μ M o vehículo (control) en medio osteogénico, durante los tiempos indicados. Luego se determinó la actividad de FAL colorimétricamente, como se indica en la Metodología. La gráfica muestra valores (UI/L) resultantes de calcular el promedio \pm DE de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. *p <0.02 vs control.

V-3- Modulación de la actividad de FAL por ADP

Cuando se realizó el tratamiento de los OBCs con ADP 10 μ M en medio osteogénico, se observó que la actividad de FAL disminuyó notablemente a los 14 días, aproximadamente en un 55% respecto del control, mientras que no se observaron cambios significativos a tiempos menores de incubación (Fig. 12A). Para confirmar estos datos, se utilizó ADP β S en los tratamientos celulares. Como se observa en la Fig. 12B, a los días 7 y 10 de tratamiento con ADP β S 10 μ M la actividad de FAL disminuyó en un 40 y 30% respectivamente en comparación con los controles.

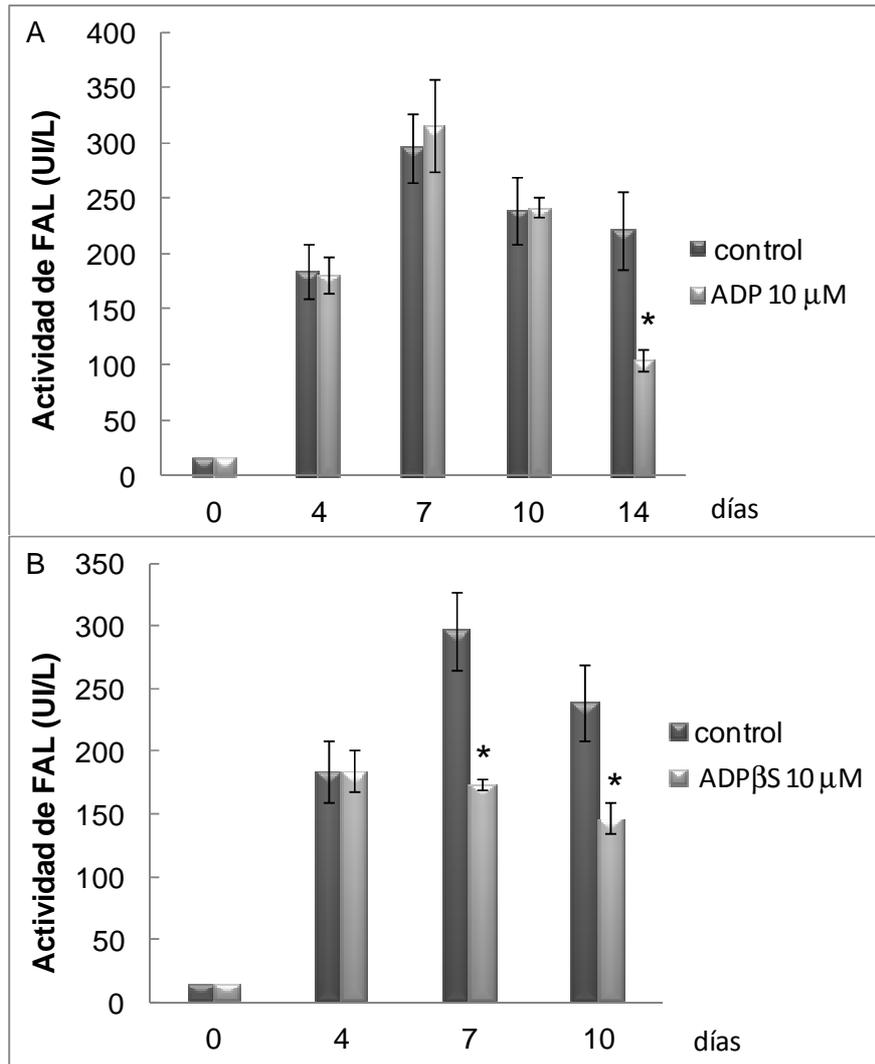


Figura 12. Determinación de la actividad de FAL en los OBCs estimulados con ADP o ADPβS. Las células se incubaron con ADP (A), ADPβS (B) o vehículo (control) en medio osteogénico, durante los tiempos indicados. Luego se determinó la actividad de FAL colorimétricamente, como se indica en la Metodología. La gráfica muestra los valores (UI/L) promedio \pm DE de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. * $p < 0.001$ vs control.

V-4- Modulación de la actividad de FAL por UDP

El tratamiento de OBCs con UDP 10 μ M en medio osteogénico, no afectó la actividad de esta enzima a los tiempos estudiados respecto a los controles (Fig. 13).

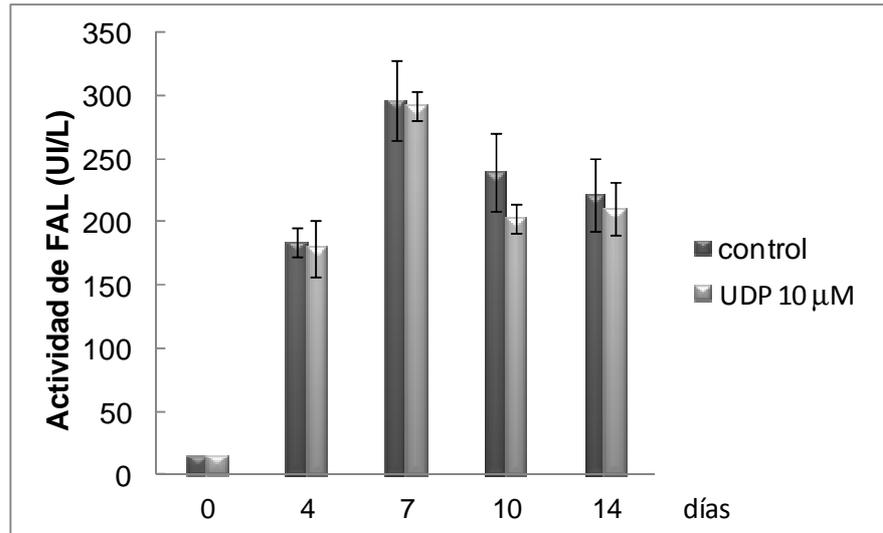


Figura 13. Determinación de la actividad de FAL en los OBCs estimulados con UDP. Las células se incubaron con UDP 10 μ M o vehículo (control) en medio osteogénico, durante los tiempos indicados. Luego se determinó la actividad de FAL colorimétricamente, como se describe en la Metodología. La gráfica muestra los valores (UI/L) promedio \pm DE de 2 experimentos independientes realizados por triplicado. $p > 0.05$ en todos los casos.

V-5- Modulación de la actividad FAL por ATP γ S y UTP 100 μ M

A continuación, se realizaron idénticos experimentos con los agonistas ATP γ S y UTP empleando concentraciones de 10 y 100 μ M durante 7 días de tratamiento (Fig. 14), tiempo en que la actividad de FAL mostró alcanzar un máximo en los controles.

En la Fig. 14 se puede observar que tanto ATP γ S como UTP 10 y 100 μ M generaron estímulos similares sobre la actividad de FAL al día 7. Ambos agonistas mostraron incrementos de un 35% aproximadamente respecto a los controles, a las dosis estudiadas.

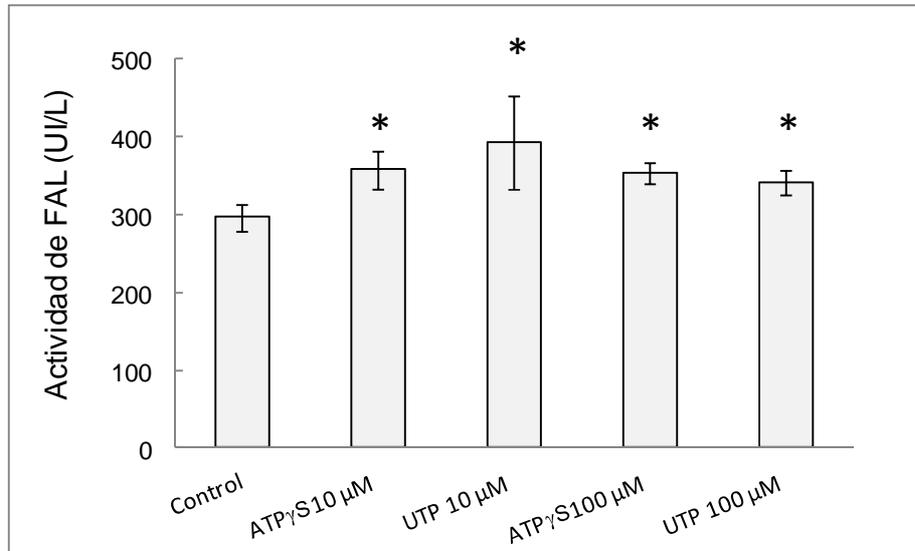


Figura 14. Determinación de la actividad de FAL en los OBCs estimulados con ATP, ATP γ S y UTP. Las células fueron incubadas en medio osteogénico conteniendo ATP, ATP γ S o UTP 10 y 100 μ M o vehículo, durante 7 días. Posteriormente se determinó la actividad de FAL colorimétricamente, como se indica en la Metodología. Los valores (UI/L) representan el promedio \pm DE de dos experimentos independientes realizados por triplicado. * $p < 0.02$ vs control.

De esta serie de experimentos podemos concluir que, el tratamiento con ATP, ATP γ S o UTP estimuló la actividad de FAL (Fig. 10, 11 y 14), lo que sugiere que los receptores responsivos a estos nucleótidos podrían ejercer un efecto positivo sobre la diferenciación celular.

Por otro lado, se puede observar que ADP, ADP β S y UDP no mostraron efectos positivos sobre la actividad de FAL respecto a los controles durante los tiempos estudiados (Fig. 12 y 13). La diferente respuesta observada entre ADP y ADP β S sugiere que productos de la hidrólisis de ADP (como AMP y adenosina) podrían interferir en su efecto. Dado que el ADP β S es agonista de los receptores P2Y₁, P2Y₁₂ y P2Y₁₃ y agonista parcial de los P2Y₁₁ no se descarta la participación de estos subtipos en la regulación negativa de la actividad de FAL. El hecho de que UDP no afectó la actividad de FAL sugiere que los receptores P2Y₆, en las condiciones estudiadas, posiblemente no estarían involucrados o no mostrarían tener un rol preponderante en la modulación de la diferenciación de osteoblastos de rata.

VI- Rol de la vía PI3K/AKT en la diferenciación de los OBCs

Se evaluó si la vía PI3K/AKT participa en la acción estimuladora del ATP sobre la diferenciación celular. Para ello, se determinó la actividad de FAL en los OBCs controles y tratados con ATP 10 y 100 μM en presencia y ausencia del inhibidor de PI3K (Ly294002) como se indica en la Metodología. Se puede observar en la tabla 2 y 3, que el estímulo generado por ATP, ATP γ S o UTP 10 y 100 μM sobre la actividad de FAL luego de 7 días de tratamiento fue abolido en presencia del inhibidor Ly294002, sugiriendo la participación de la vía PI3K/AKT en la modulación de la maduración de los OBCs mediada por la señalización purinérgica (tabla 2 y tabla 3).

Días	-Ly294002		+Ly294002	
	Control	ATP 10 μM	Control	ATP 10 μM
0	15.1 \pm 0.002	15.2 \pm 0.002	Nd	Nd
3	133.65 \pm 14.79	142.22 \pm 16.33	Nd	Nd
7	298.56 \pm 13.88	397.76 \pm 17.96**	285.88 \pm 8.32	270.01 \pm 9.15
9	151.37 \pm 19.36	211.16 \pm 25.28*	Nd	Nd

Tabla 2. Modulación de la actividad de FAL por ATP y participación de PI3K. Las células fueron incubadas en medio osteogénico conteniendo ATP 10 μM o vehículo, en presencia o ausencia de Ly294002 10 μM , durante los tiempos indicados. Posteriormente se determinó la actividad de FAL colorimétricamente, como se indica en la Metodología. Los valores (UI/L) constituyen el promedio \pm DE de dos experimentos independientes realizados por triplicado.*p < 0.02, **p < 0.01 vs control.

	-Ly294002	+Ly294002
Control	298.56 \pm 13.88	285.88 \pm 08.32
ATP γ S 100 μM	355.5 \pm 08.09*	320.78 \pm 15.76
UTP 100 μM	345.07 \pm 07.89*	318.98 \pm 10.17

Tabla 3. Participación de PI3K en la inducción de la actividad de FAL por ATP γ S y UTP en los OBCs. Las células fueron incubadas en medio osteogénico conteniendo ATP γ S o UTP 100 μ M o vehículo, en presencia o ausencia de Ly294002 10 μ M, durante 7 días. Luego se determinó la actividad de FAL colorimétricamente, como se indica en la Metodología. Los valores (UI/L) representan el promedio \pm DE de dos experimentos independientes realizados por triplicado.*p < 0.02 vs control.

Los datos presentados hasta aquí demuestran que el ATP, el ATP γ S y el UTP estimulan la proliferación celular de los osteoblastos de calvaria de rata, además, el ATP γ S mostró estimular el progreso de la fase G₀ a S del ciclo celular. Estos nucleótidos también mostraron incrementar la actividad de la FAL, sugiriendo estimular la diferenciación de los osteoblastos. A su vez, la estimulación de la proliferación y diferenciación celular fue inhibida en presencia de Ly294002, demostrando que la vía PI3K/AKT se encuentra involucrada en los efectos ejercidos por los agonistas purinérgicos, ATP, ATP γ S y UTP, en los osteoblastos de rata, validando las reseñas preliminarmente observadas en células ROS17/2.8 (Katz y col., 2011).

Un estudio minucioso realizado por Wildman y colaboradores (2003) sobre las propiedades farmacológicas de los receptores P2Y₂ y P2Y₄ expresados en oocitos de rata, demuestran que ambos receptores exhiben equipotentes respuestas frente al ATP y UTP pero no frente al ATP γ S. Ellos demostraron que el ATP γ S es un agonista completo de receptores P2Y₂ y débil de P2Y₄, sugiriendo que el ATP γ S podría ayudar a distinguir entre los subtipos P2Y₂ y P2Y₄ (Wildman y col., 2003). Considerando esta información, los resultados obtenidos sugieren que los receptores P2Y₂, responsivos a ATP, ATP γ S y UTP, estimulan la proliferación y maduración de los OBCs, dado que los otros nucleótidos usados no mostraron dicha respuesta. Los efectos mostrados por ADP y ADP β S sobre la actividad de FAL sugieren que los receptores P2Y₁, ₁₂ y ₁₃ podrían modular negativamente la diferenciación de los osteoblastos a partir del día 7. Además, los diferentes efectos mostrados por estos dos agonistas, podrían deberse a la contribución de los receptores P1, que se activan por adenosina, uno de los productos de la hidrólisis del ADP.

VII- Efecto de la estimulación purinérgica sobre la formación de nódulos de mineralización ósea y morfología celular

La mineralización ósea es un proceso que se acompaña por un incremento en la deposición de calcio y fosfato, y es apreciable luego de la diferenciación celular.

VII-1- Formación de nódulos de mineralización ósea

Los nódulos de mineralización ósea contienen grandes cantidades de calcio que pueden ser fácilmente detectados con la tinción de rojo de alizarina. Para determinar el grado de mineralización de los cultivos, los OBCs fueron tratados con los diversos nucleótidos o vehículo (control) en medio osteogénico durante los tiempos indicados y luego se llevó a cabo la tinción con rojo de alizarina como se indica en la Metodología.

Se puede apreciar en las fotografías de la Fig. 15 y en forma más evidente en el gráfico de barras de la Fig. 16, que los tratamientos con ATP y UTP 100 μ M incrementaron la deposición de calcio alrededor del día 22, respecto a los controles. Mientras que en los tratamientos con ADP y UDP no se observaron cambios significativos.

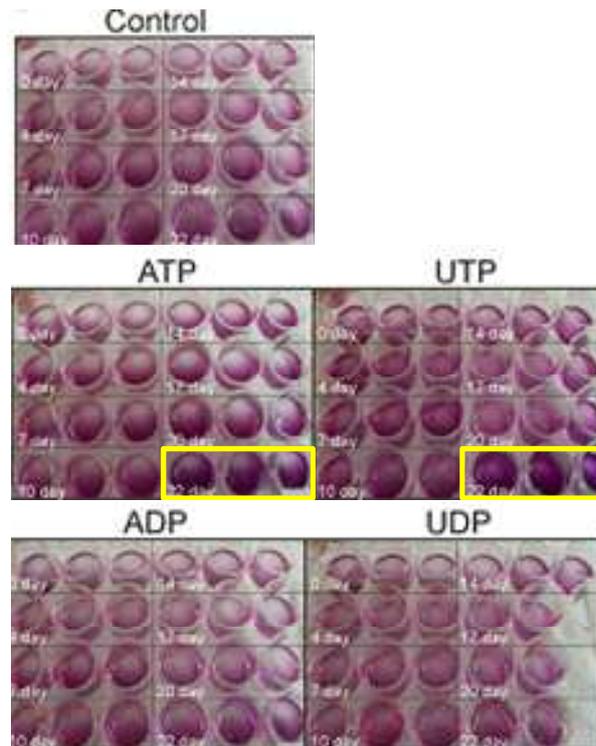


Figura 15. Determinación de nódulos de mineralización ósea por tinción con rojo de alizarina. Los OBCs fueron incubados en medio osteogénico en presencia o ausencia de ATP, UTP, ADP o UDP 100 μ M, durante los tiempos indicados. Luego, las muestras se tiñeron con rojo de alizarina al 2%, se adicionó NaOH 0.1N (500 μ l/cavidad). Los recuadros en amarillo indican las condiciones en las que el estímulo fue mayor.

VII-2- Cambios morfológicos

Se sabe que la morfología típica de un osteoblasto activamente secretor y maduro es cuboide (Cooper y col., 1998; Orriss y col., 2006). Por ello, para observar la morfología celular, se reprodujeron las condiciones del experimento anterior en células crecidas sobre cubre-objetos de vidrio y se obtuvieron las correspondientes fotos microscópicas. Seguidamente, se comparó la morfología celular entre las distintas condiciones para evaluar posibles cambios inducidos por los diversos agonistas.

Los cultivos alcanzaron un estado de madurez celular luego de varios días de incubación en medio osteogénico (~día 15), y los nódulos de mineralización pudieron visualizarse alrededor del día 20 o posterior al mismo. Por esta razón,

se estudiaron los efectos de los nucleótidos hasta el día 22 de tratamiento en medio osteogénico. Los OBCs controles y/o los incubados en presencia de UDP o ADP comenzaron a presentar formas cuboides a partir del día 20, sin advertirse diferencias entre ellos, la acumulación de calcio depositado comenzó a hacerse visible a partir del día 17 y fue fácilmente detectable al día 22 de tratamiento (Fig. 15 y 16).

Se pudo observar que los cultivos tratados en medio osteogénico por varios días con ATP o UTP 100 μ M, experimentaron cambios morfológicos importantes respecto a los controles. Particularmente este grupo (ATP o UTP), luego de una observación bajo microscopía de contraste de fase, presentó un mayor número de células poligonales cuboides que en el resto de los cultivos, siendo notorios estos cambios a partir del día 7 de tratamiento (Fig. 16A). Las células tratadas con ATP o UTP 100 μ M incrementaron significativamente la formación de depósitos de calcio respecto a los controles al día 22 (ATP: 1.970.2 y UTP: 2.370.3 vs Control: 1.370.1 en unidades arbitrarias) (Fig. 16B y C). Además, en los últimos estadios del experimento (días 20-22), los OBCs tratados con ATP y UTP, presentaron un importante alargamiento de su citoplasma con abundantes prolongaciones dendriformes e interconexiones entre ellas.

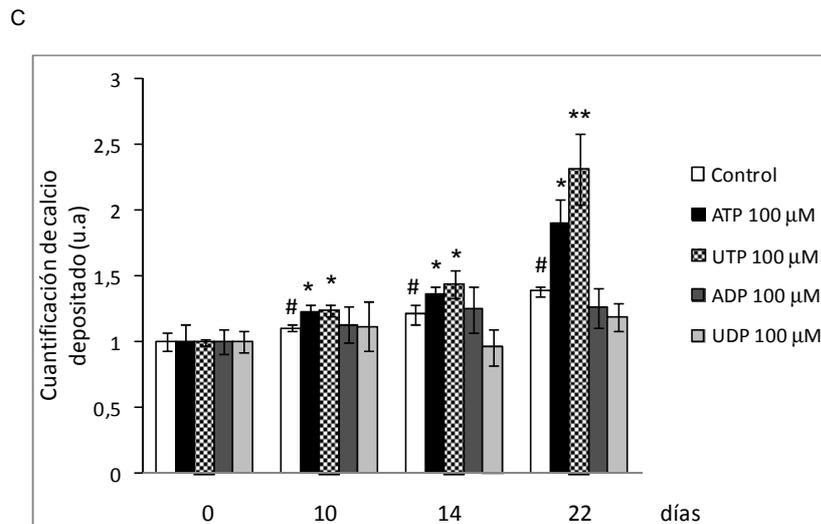
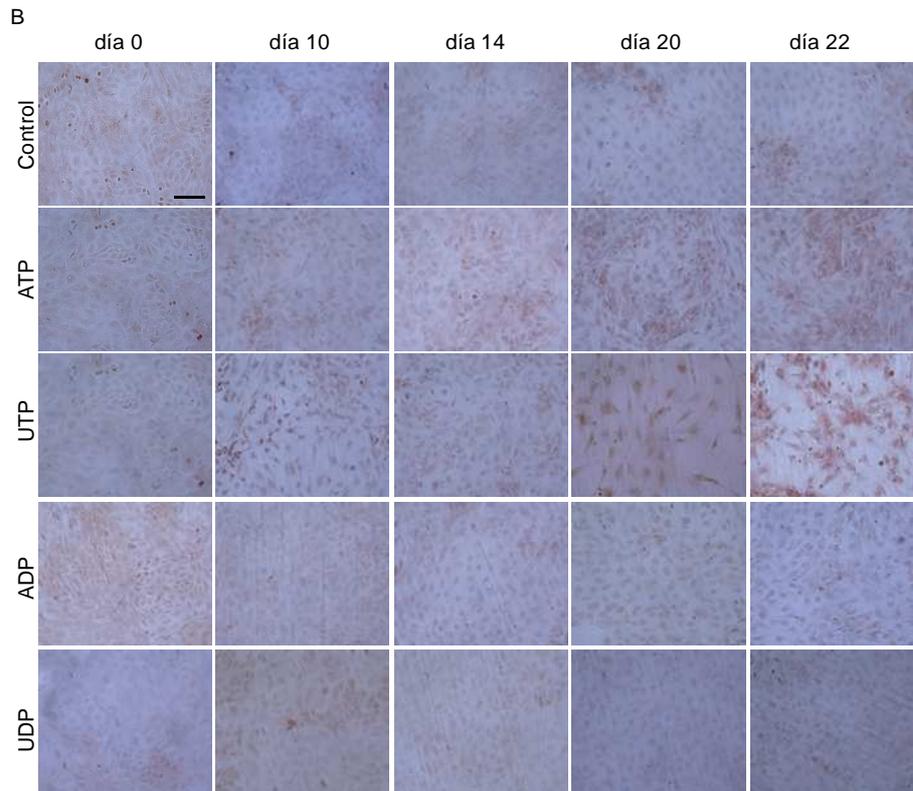
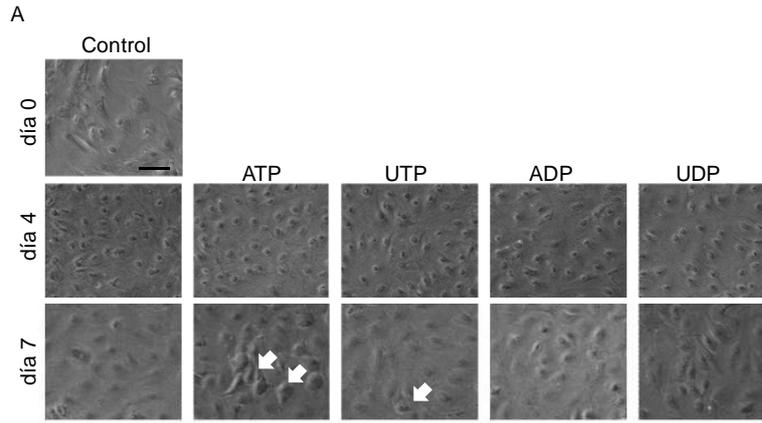


Figura 16. Determinación de cambios morfológicos y grado de mineralización ósea en los OBCs bajo estímulos purinérgicos. Los osteoblastos crecidos sobre cubre-objetos de vidrio fueron incubados en medio osteogénico en presencia o ausencia de los nucleótidos a concentraciones de 100 μM , durante los tiempos indicados. Posteriormente se procedió a la tinción con rojo de alizarina y al registro fotográfico. Las fotografías en (A) muestran imágenes de células capturadas por microscopía de contraste de fase. Las flechas muestran las células con forma cuboide, típica de osteoblastos maduros. Barra de escala 50 μm . Las fotografías en (B) muestran los OBCs, teñidos con rojo de alizarina, cultivados bajo diferentes tratamientos. Los OBCs tratados con ATP o UTP 100 μM exhiben morfología típica de osteoblastos maduros a partir del día 7 de tratamiento lo cual se corrobora por una discreta mineralización a partir del día 10. Los datos son representativos de 2 experimentos independientes. Barra de escala 120 μm . El gráfico en (C) representa la cuantificación, expresada en unidades arbitrarias (u.a), de la deposición mineral medida posteriormente a la tinción con rojo de alizarina como se indica en la Metodología. Los datos son promedios \pm DE de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.02$ vs control y # $p < 0.05$ vs control del día 0.

La determinación de las deposiciones de calcio con rojo alizarina permite concluir que la estimulación purinérgica incrementa la mineralización de la matriz extracelular en los cultivos de osteoblastos a través de receptores responsivos a ATP y UTP, los cuales aparentemente también son responsables de inducir cambios morfológicos tempranos en este tipo celular. Estos resultados concuerdan con diversos estudios, que demuestran que los osteoblastos activos maduros tienen una morfología cuboide característica (Cooper y col., 1998; Orriss y col., 2006), como se detectó en los osteoblastos tratados con ATP o UTP desde el día 7 en adelante. Estos datos involucran a los receptores P2Y_2 y no permiten descartar la participación del subtipo P2Y_4 , puesto que en estos experimentos no se pudo utilizar el compuesto $\text{ATP}\gamma\text{S}$, agonista débil de los receptores P2Y_4 . Si bien no puede descartarse, se subestima la participación de los receptores P2X en la acción del ATP sobre la mineralización observada aquí, puesto que en este estadio la expresión de esta familia de receptores se encuentra disminuida (Orriss y col., 2006),

En desacuerdo con los resultados presentados en esta Tesis, algunos estudios muestran que el ATP y UTP a concentraciones $\geq 1\mu\text{M}$, inhiben la mineralización ósea en cultivos primarios de osteoblastos de rata (Hoebertz y col., 2002; Orriss y col., 2007). Los trabajos mencionados fueron realizados empleando como modelo de estudio ratas Sprague Dawley en un medio osteogénico suplementado con dexametasona, en cambio en esta Tesis se utilizaron ratas Wistar y medio osteogénico carente de dexametasona. Esto podría explicar la diferencia observada ya que se ha demostrado que ésta droga bloquea a Runx-2, un factor de transcripción requerido para la diferenciación de los osteoblastos (Zhang y col., 2012). Además, en células mesenquimales progenitoras, la dexametasona inhibe la vía Wnt/ β -catenina, una vía de señalización involucrada en la diferenciación de los osteoblastos (Naito y col., 2012). Por otro lado, se ha reportado que los glucocorticoides reducen la formación de hueso a través de la inducción de apoptosis de los osteoblastos y osteocitos (O'Brien y col., 2004).

VIII- Determinación de diversas proteínas indicadoras de diferenciación osteoblástica por QRT-PCR

Para verificar el efecto de los nucleótidos sobre la diferenciación de los OBCs, se estudió por QRT-PCR la modulación de la expresión génica de proteínas asociadas a la diferenciación osteoblástica luego de la estimulación con los distintos nucleótidos durante diversos tiempos.

VIII-1- Efecto de la estimulación purinérgica sobre la expresión de FAL

Como se puede ver en la Fig. 17 los tratamientos con ATP γ S o UTP 10 y 100 μM produjeron incrementos en los niveles del ARNm de FAL de aproximadamente un 30% respecto al control al día 4. Estos resultados se correlacionan con los datos mostrados en la Fig. 10, donde se observa que la actividad de FAL comienza a aumentar a partir de ese día de tratamiento.

Se puede apreciar que en las células tratadas con ADP β S, la expresión del ARNm correspondiente a FAL disminuyó respecto a los controles en los días 3 y 4, alcanzando valores similares al control al día 7 de tratamiento.

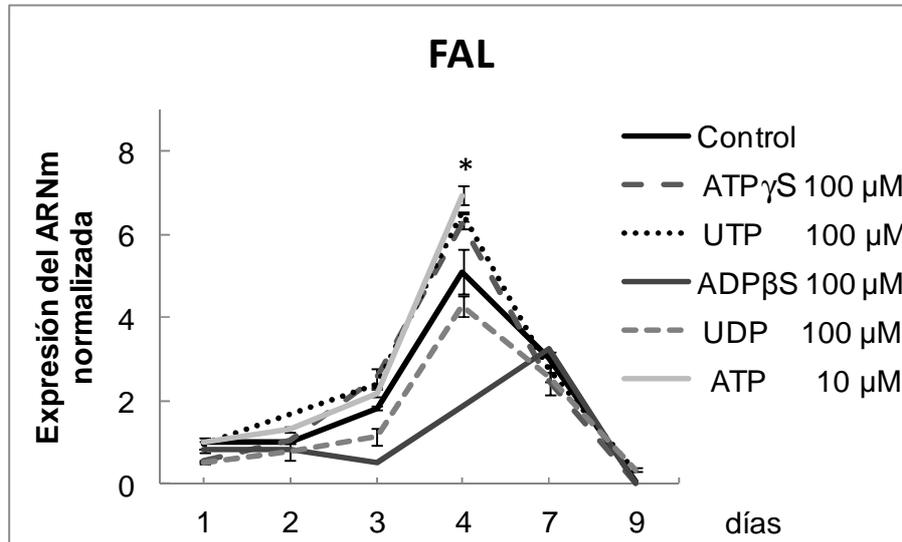


Figura 17. Expresión de FAL en los OBCs luego de estímulos purinérgicos. Los cultivos de osteoblastos fueron incubados en medio osteogénico en presencia o ausencia de ATP γ S, UTP, ADP β S o UDP a las concentraciones indicadas durante 1, 2, 3, 4, 7 y 9 días. Luego estas muestras fueron procesadas como se indica en la Metodología para la cuantificación del ADNc correspondiente a FAL por QRT-PCR. Los gráficos pertenecen a un experimento representativo de tres experimentos individuales procesados por triplicado. *p < 0.05 vs control.

VIII-2- Efecto de la estimulación purinérgica sobre la expresión de BSP

Como se puede observar en la Fig. 18, en los controles BSP presentó un perfil de expresión génica que alcanzó un máximo al día 7. Los OBCs tratados con ATP γ S, UTP o ADP β S 100 μ M también mostraron dicho perfil, notándose un gran estímulo sobre la expresión génica de BSP por sobre los controles en las condiciones tratadas con ATP γ S 10 y 100 μ M y UTP 100 μ M a todos los tiempos estudiados. El máximo incremento alcanzado fue de aproximadamente 2 veces por sobre el valor de los controles al día 7 de tratamiento. En el caso

del tratamiento con UDP, se observó una expresión de BSP constante en el tiempo a partir del día 7.

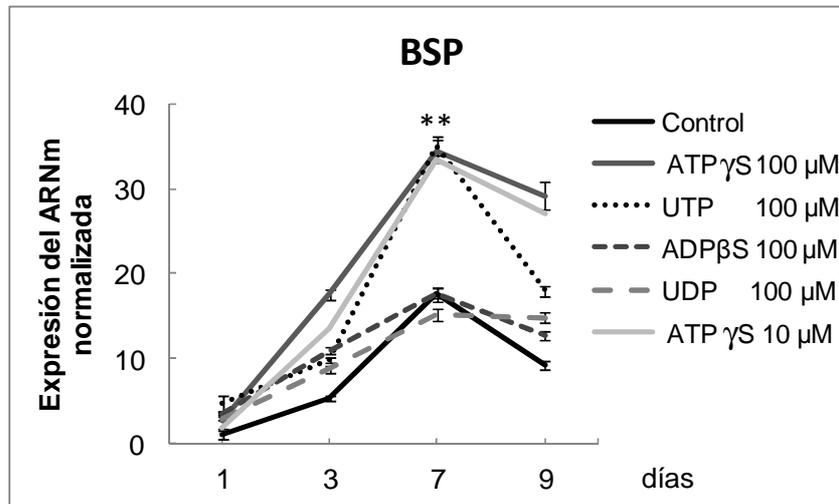


Figura 18. Expresión de BSP en los OBCs luego de estímulos purinérgicos. Los cultivos de osteoblastos fueron incubados en medio osteogénico en presencia o ausencia de ATPγS, UTP, ADPβS o UDP a las concentraciones indicadas durante 1, 3, 7 y 9 días. Luego estas muestras fueron procesadas como se indica en la Metodología para realizar la cuantificación del ADNc correspondiente a BSP por QRT-PCR. Los gráficos pertenecen a un experimento representativo de tres experimentos individuales procesados por triplicado. *p < 0.05, **p < 0.02 versus control.

VIII-3- Efecto de la estimulación purinérgica sobre la expresión de Col1α1

La Fig. 19 muestra el perfil de expresión del Col1α1 (Colágeno Tipo 1 cadena α1). En las células controles Col1α1 presenta un pico de expresión al día 3. El tratamiento con UTP 100 μM no mostró cambios significativos respecto a los controles a los tiempo estudiados. Sin embargo, para los estudios realizados al día 2 de diferenciación osteogénica, los tratamientos con ATPγS o UTP 10 μM, sí mostraron incrementar la expresión de Colágeno1 α1 y α2 respecto a los controles (tabla 4).

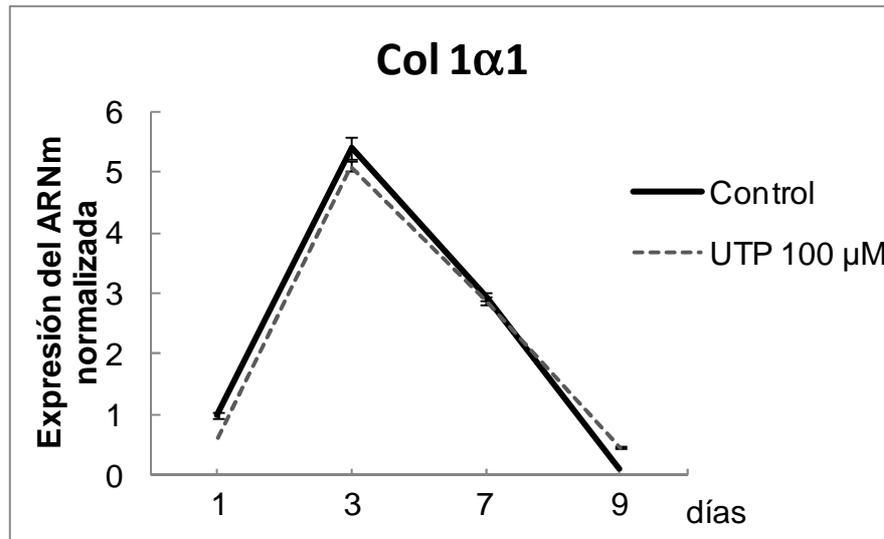


Figura 19. Expresión de Col1α1 en OBCs tratados con UTP. Los cultivos de osteoblastos fueron incubados en medio osteogénico en presencia o ausencia de UTP 100 μM durante 1, 3, 7 y 9 días. Luego estas muestras fueron procesadas como se indica en la Metodología para cuantificar el ADNc correspondiente a Col1α1 por QRT-PCR, y los resultados fueron normalizados respecto a los controles del día 1. Se muestran los valores promedios ± DE de un experimento realizado por triplicado. $p > 0.05$.

	<i>Col1α1</i>	<i>Col1α2</i>
Control	1,00± 0,11	1,00± 0,11
ATPγS 10 μM	1,60±0,10*	1,39±0,07*
UTP 10 μM	1,50± 0,07*	1,30±0,03*

Tabla 4. Expresión de Col1α1/2 en los OBCs tratados con ATPγS o UTP. Los cultivos de osteoblastos fueron incubados en medio osteogénico en presencia o ausencia de ATPγS o UTP 10 μM durante 2 días. Luego estas muestras fueron procesadas como se indica en la Metodología para cuantificar el ADNc correspondiente a los genes para Col1 α1/2 por QRT-PCR, y los resultados fueron normalizados respecto a los controles del día 2. Se muestran los valores promedios ± DE de dos experimentos realizados por triplicado. * $p < 0.05$ versus control.

VIII-4- Efecto de la estimulación purinérgica sobre la expresión de OPG

En la Fig. 20 se puede observar la expresión de OPG en controles y tratados. Durante la incubación de estas células en medio osteogénico, la expresión génica de esta proteína presentó un pico al día 3. Los OBCs tratados con los diferentes agonistas, a concentraciones de 100 μ M, presentaron niveles de expresión inferiores respecto a los controles, pero manteniendo el mismo perfil. Sin embargo, para los estudios realizados al día 2 de diferenciación osteogénica, los tratamientos con ATP γ S o UTP 10 μ M, sí mostraron incrementar la expresión de OPG respecto a los controles (tabla 5).

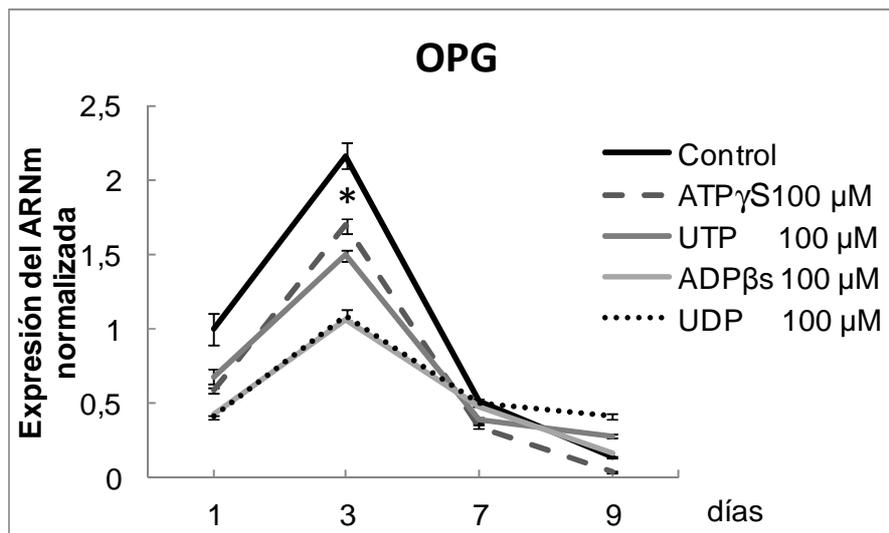


Figura 20. Expresión de OPG en los OBCs luego de estímulos purinérgicos. Los cultivos de osteoblastos fueron incubados en medio osteogénico en presencia o ausencia de ATP γ S, UTP, ADP β S o UDP 100 μ M durante 1-9 días. Luego estas muestras fueron procesadas como se indica en la Metodología para realizar la cuantificación del ADNc correspondiente a OPG por QRT-PCR, y los resultados fueron normalizados respecto a los controles del día 1. Los gráficos pertenecen a un experimento representativo de dos experimentos individuales procesados por triplicado. * $p < 0,05$ vs control.

<i>Control</i>	<i>ATPγS 10 μM</i>	<i>UTP 10 μM</i>
1,00 \pm 0,10	1,37 \pm 0,08*	1,30 \pm 0,07*

Tabla 5. Expresión de OPG en los OBCs tratados con ATP γ S o UTP. Los cultivos de osteoblastos fueron incubados en medio osteogénico en presencia o ausencia de ATP γ S o UTP 10 μ M durante 2 días. Luego estas muestras fueron procesadas como se indica en la Metodología para cuantificar el ADNc correspondiente a los genes para OPG por QRT-PCR, y los resultados fueron normalizados respecto a los controles del día 2. Se muestran los valores promedios \pm DE de dos experimentos realizados por triplicado. *p < 0.05 versus control.

Las condiciones osteogénicas de cultivo empleadas en esta Tesis muestran que, la actividad de FAL comienza a incrementar alrededor del día 4, y presenta un pico de actividad al día 7. Además, los cambios en los niveles de expresión génica de FAL se detectaron previamente al incremento de su actividad, demostrando una correlación temporal. Estos resultados concuerdan con estudios que sugieren que durante la diferenciación de osteoblastos *in vitro* la actividad de la FAL comienza a incrementar alrededor del día 4 y se obtienen osteoblastos maduros alrededor del día 7 (Quarles y col., 1992).

Se puede ver que el tratamiento con ATP, ATP γ S y UTP incrementaron los niveles de FAL al día 4 respecto a los controles indicando un rol importante para los receptores P2Y₂ en el proceso de diferenciación de los OBCs. También se puede ver en los resultados que los receptores P2Y_{1,12 y 13} podrían ejercer efectos negativos en este proceso.

La BSP, otro marcador de diferenciación osteoblástica, es una proteína importante en la biomineralización de la matriz extracelular (Ganss y col., 1999; Giachelli y Steitz., 2000; Gordon y col., 2007) cuya expresión se encuentra incrementada alrededor del día 11 de diferenciación en los osteoblastos (Sila-Asna y col., 2007; Liu y col., 2008). El tratamiento con ATP γ S y UTP incrementó los niveles génicos de esta proteína al día 7 respecto a los controles indicando que la activación purinérgica, vía receptores P2Y₂, podría mejorar la función y maduración de los OBCs.

Se ha reportado que la expresión de Colágeno tipo I en estadios tempranos cumple un rol preponderante en la maduración de los osteoblastos (Quarles y col., 1992). Aquí se pudo ver que el ATP γ S y UTP al día 2 de tratamiento incrementaron los niveles génicos de ésta proteína, sugiriendo la participación de los receptores P2Y₂.

En la literatura, los efectos directos de OPG sobre la diferenciación de los osteoblastos aún no están del todo claros. En esta Tesis se observó que en los OBCs la expresión de OPG se inhibió bajo el tratamiento con los nucleótidos a concentraciones de 100 μ M y se estimuló con ATP γ S y UTP 10 μ M a tiempos tempranos. Los resultados de esta Tesis respecto al efecto inhibitorio de los nucleótidos sobre la expresión de OPG en los OBCs concuerdan con los estudios de Hayton y Evans (Hayton y col., 2005; Evans y col., 2006). En esos trabajos se demuestra que el ATP y la adenosina inhiben la secreción y expresión de OPG en osteoblastos humanos, sugiriendo estimular la osteoclastogénesis. Desde el punto de vista fisiológico se podría especular que altas dosis de agonistas de los receptores P2 podrían modular el remodelado óseo al promover la formación y la resorción de hueso, y que a bajas dosis los agonistas de los receptores P2Y₂ inhibirían la resorción ósea.

La expresión de OPG ha sido observada en las etapas tardías (alrededor del día 21) de maduración de los osteoblastos por varios autores (Yang y col., 2011; Xu y col., 2011; Barbagallo y col., 2010), y en esta Tesis el máximo nivel de expresión génica para esta proteína, aparece más tempranamente (día 3). A diferencia de esta Tesis, los autores de esos trabajos realizaron los estudios en un medio osteogénico de diferenciación que contenía dexametasona. En los estudios pioneros, reportados en la literatura, el medio osteogénico se componía de un medio suplementado con ácido ascórbico y β -glicerofosfato, el cual era suficiente para acelerar la deposición de minerales hidroxiapatita y calcio, la morfología, la síntesis de colágeno, y la actividad de FAL, característico de osteoblastos diferenciados (Schoeters y col., 1988). A partir de un estudio de Nakagawa y col., (1990) en líneas celulares MC3T3E-1, algunos autores comenzaron a incorporar dexametasona al medio osteogénico. Sin embargo, varios estudios demuestran que la dexametasona tiene la capacidad de incrementar la osteoclastogénesis al inhibir la producción de

OPG en los osteoblastos (Konda y col., 2008), así como en otros tipos celulares como adipositos (Hozumi y col., 2009), y en células de cáncer de mama (Rochner y col., 2009). Por tales motivos, se podría suponer que en los trabajos donde los autores utilizan dexametasona, éste corticoide retrasaría la expresión de OPG. El medio utilizado en esta Tesis no contiene dexametasona, lo que permite suponer que la expresión de OPG, al no encontrarse inhibida, se presenta más tempranamente.

IX- Determinación de los niveles de expresión de diversas BMPs por QRT-PCR

Para determinar el efecto de la estimulación purinérgica sobre la expresión génica de proteínas inductoras de la formación de hueso, se estudiaron, por QRT-PCR, las citocinas BMP-1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7, en células controles y tratadas con los distintos nucleótidos en medio osteogénico durante diferentes tiempos.

IX-1- Efecto de la estimulación purinérgica sobre la expresión de BMP-4

En la Fig. 21A se muestran los niveles de expresión génica de BMP-4 en los OBCs tratados con ATP γ S 10 y 100 μ M. El tratamiento con ATP γ S 100 μ M incrementó los niveles de expresión génica de BMP-4 en ~ 250% (~ 2.5 veces) respecto a los controles, presentando un máximo al día 7 de tratamiento. Mientras que no se observaron cambios significativos en los tratamientos con ATP γ S 10 μ M. Ante estas respuestas se decidió continuar los estudios de las demás citocinas bajo tratamientos con los agonistas a concentraciones de 100 μ M.

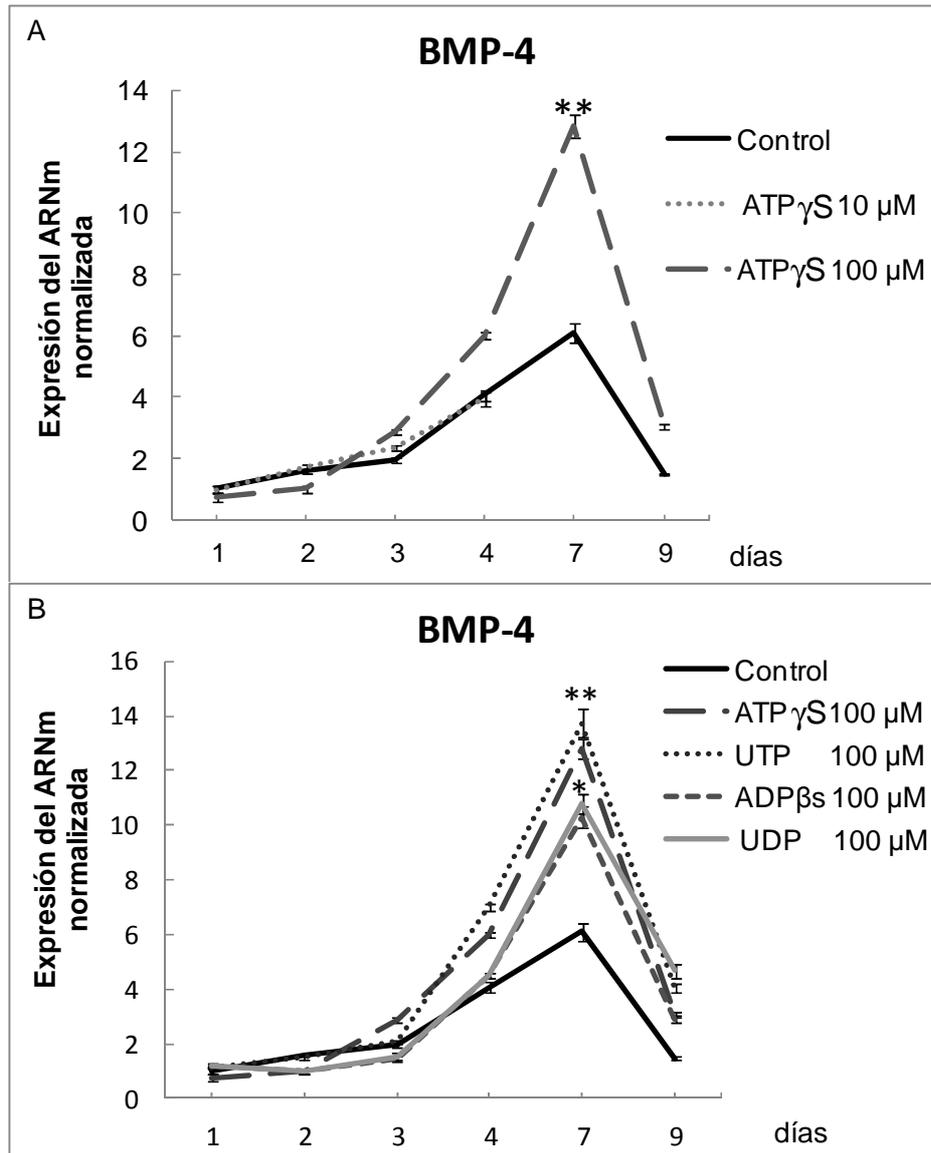


Figura 21. Expresión de BMP-4 en los OBCs luego de estímulos purinérgicos.

Los cultivos de osteoblastos fueron incubados en medio osteogénico en presencia o ausencia (control) de ATP γ S, UTP, ADP β S o UDP a las concentraciones indicadas durante 1-9 días. Luego estas muestras fueron procesadas como se indica en la Metodología para realizar la cuantificación del ADNc correspondiente a BMP-4 por QRT-PCR. Los gráficos pertenecen a un experimento representativo de tres experimentos individuales procesados por triplicado. *p < 0.05, **p < 0.02 vs control.

Si bien todos los nucleótidos estudiados ejercieron un efecto positivo sobre la expresión de BMP-4 respecto a los controles, los tratamientos con ATP γ S y

UTP 100 μ M fueron los que produjeron respuestas de mayor intensidad (Fig. 21B).

IX-2- Efecto de la estimulación purinérgica sobre la expresión de BMP-1

Como se puede distinguir en la Fig. 22, la expresión génica de BMP-1 en los OBCs control presenta un máximo al día 7. Este perfil se mantiene en células tratadas con ATP γ S, UTP, ADP β S, o UDP 100 μ M, sin embargo, se puede observar que sólo el tratamiento con UDP incrementó la expresión de BMP-1 por sobre los controles. Por otro lado ATP γ S, UTP y ADP β S no indujeron cambios significativamente importantes respecto a los controles.

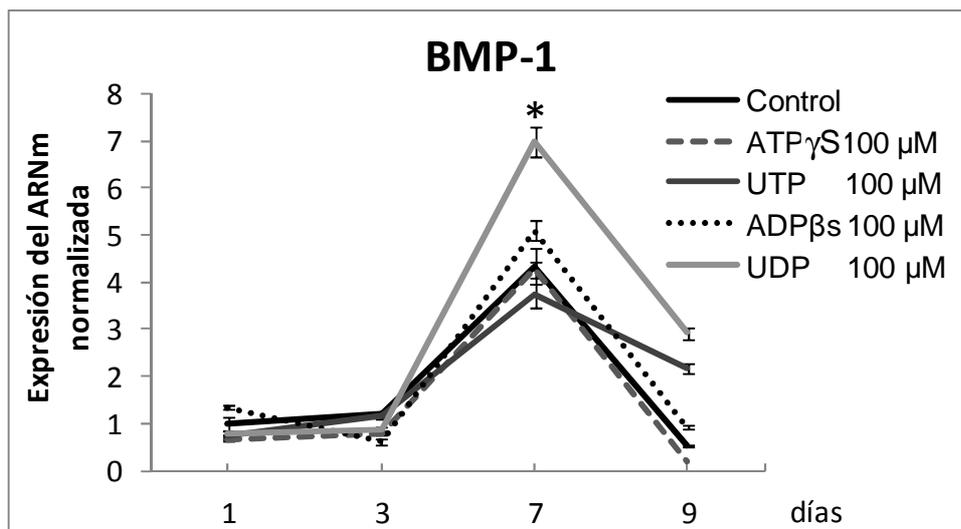


Figura 22. Expresión de BMP-1 en OBCs luego de estímulos purinérgicos. Los cultivos de osteoblastos fueron incubados en medio osteogénico en presencia o ausencia de ATP γ S, UTP, ADP β S o UDP 100 μ M durante 1, 3, 7 y 9 días. Luego estas muestras fueron procesadas como se indica en la Metodología para cuantificar el ADNc correspondiente a la BMP-1 por QRT-PCR. Los gráficos pertenecen a un experimento representativo de dos experimentos individuales procesados por triplicado. * $p < 0.05$ vs control.

IX-3- Efecto de la estimulación purinérgica sobre la expresión de BMP-2

Como se observa en la Fig. 23, el perfil de expresión de BMP-2 presenta un comportamiento ascendente en función del tiempo, coincidente con reportes que muestran incrementos de BMP-2 durante la diferenciación celular hacia osteoblastos maduros (Wei y col., 2008; Gautschi y col., 2009; Lavery y col., 2009). El ATP γ S incrementó la expresión de BMP-2 entre los días 7 y 9, mientras que UTP y ADP β S sólo la incrementaron al día 9, y UDP al día 7 (Fig. 23A y B).

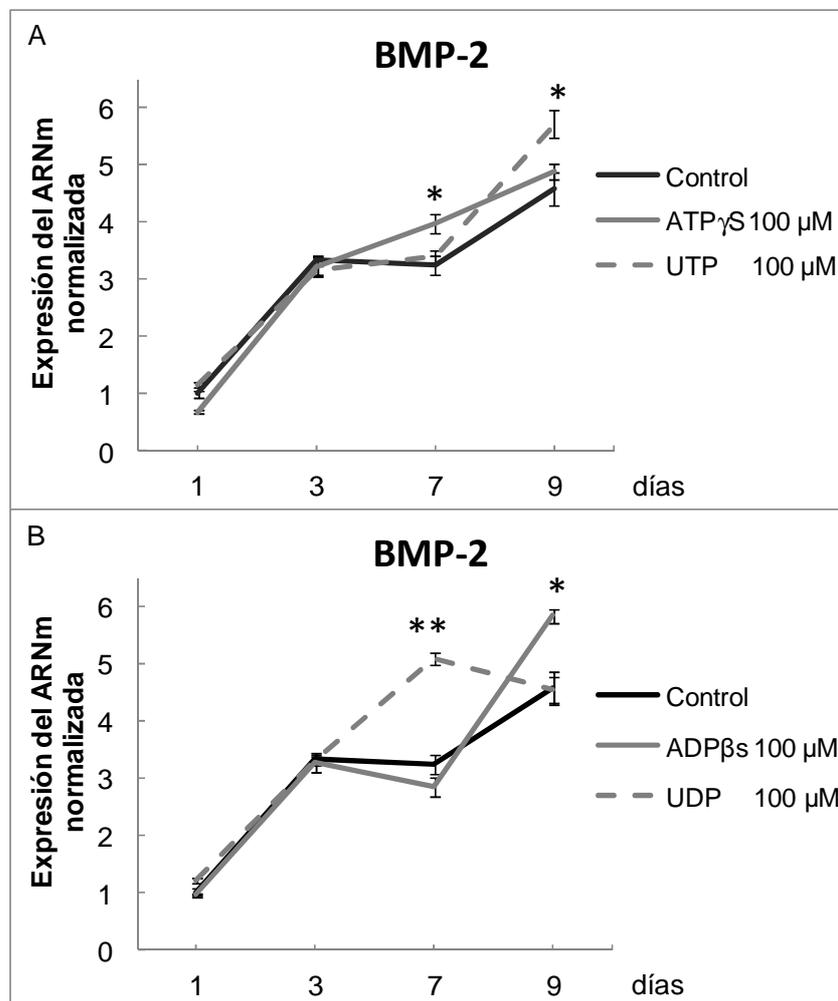


Figura 23. Expresión de BMP-2 en los OBCs luego de estímulos purinérgicos.

Los cultivos de osteoblastos fueron incubados en medio osteogénico en presencia o ausencia de ATP γ S, UTP, ADP β s y UDP 100 μ M durante 1, 3, 7 y 9 días. Luego estas muestras fueron procesadas como se indica en la Metodología para proceder a la cuantificación del ADNc correspondiente a la BMP-2 por QRT-PCR. Los gráficos

pertenecen a un experimento representativo de tres experimentos individuales procesados por triplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.02$ vs control.

IX-4- Efecto de la estimulación purinérgica sobre la expresión de BMP-3

BMP-3 presenta un perfil de expresión génica con un máximo alrededor del día 7 en los controles (Fig. 24). Las células tratadas con UTP o ADP β S 100 μ M presentaron un perfil similar pero con un notable incremento por sobre el control a los días 7 y 9. Sin embargo, el tratamiento con UDP 100 μ M incrementó la expresión de BMP-3 en forma ascendente por sobre los controles a partir del día 7. Por otro lado ATP γ S no produjo ningún cambio significativo respecto al control al día 7 e inhibió la expresión de BMP-3 al día 9.

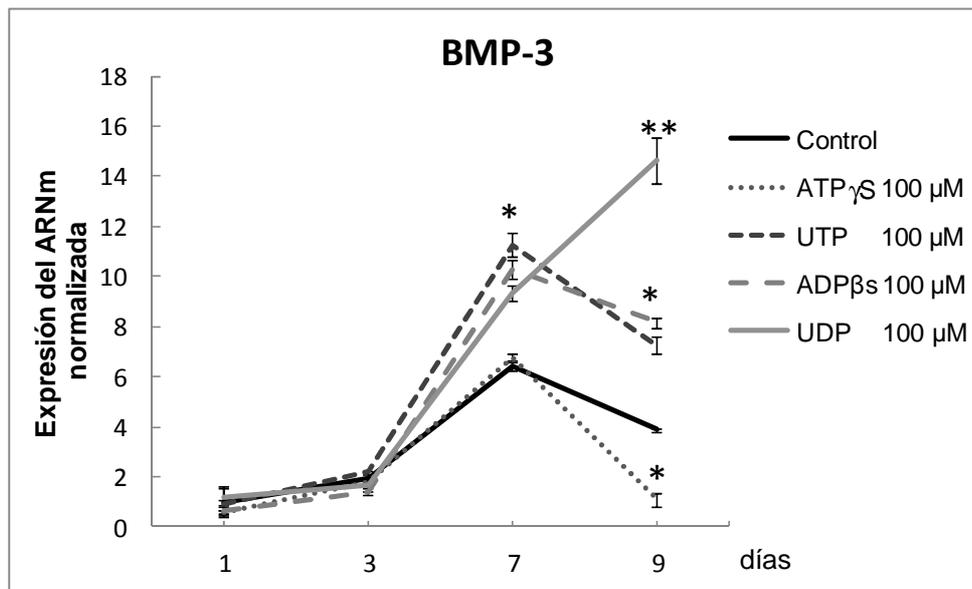


Figura 24. Expresión de BMP-3 en los OBCs luego de estímulos purinérgicos.

Los cultivos de osteoblastos fueron incubados en medio osteogénico en presencia o ausencia de ATP γ S, UTP, ADP β S o UDP 100 μ M durante 1, 3, 7 y 9 días. Luego estas muestras fueron procesadas como se indica en la Metodología para la cuantificación del ADNc correspondiente a la BMP-3 por QRT-PCR. Los gráficos pertenecen a un experimento procesado por triplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.02$ vs control.

IX-5- Efecto de la estimulación purinérgica sobre la expresión de BMP-5

En la Fig. 25 se observa que en los OBCs controles el ARNm correspondiente a BMP-5 presenta su expresión máxima al día 7 de tratamiento. Además se puede observar que los OBCs tratados con los distintos agonistas también presentaron dicho perfil, mostrando los tratamientos con ATP γ S y UTP 100 μ M incrementos en la expresión de esta citocina de ~ 2 y 2.5 veces por sobre el control respectivamente, entre el día 3 y 9.

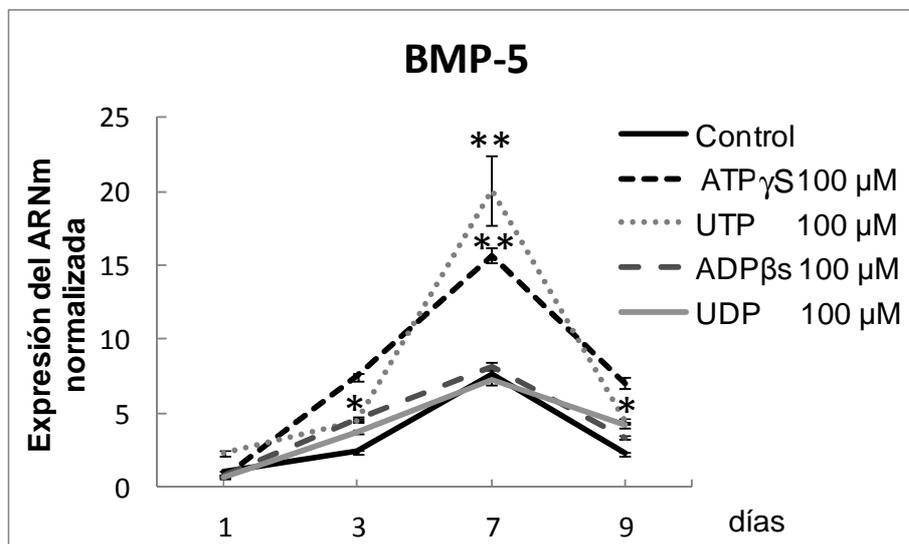


Figura 25. Expresión de BMP-5 en los OBCs luego de estímulos purinérgicos.

Los cultivos de osteoblastos fueron incubados en medio osteogénico en presencia o ausencia de ATP γ S, UTP, ADP β S o UDP 100 μ M durante 1-9 días. Luego estas muestras fueron procesadas como se indica en la Metodología para cuantificar el ADNc correspondiente a la BMP-5 por QRT-PCR. Los gráficos pertenecen a un experimento representativo de tres experimentos individuales procesados por triplicado. *p < 0.05, **p < 0.02 versus control.

IX-6- Efecto de la estimulación purinérgica sobre la expresión de BMP-6

En la Fig. 26 se puede observar que BMP-6 muestra su máxima expresión génica al séptimo día de tratamiento en los osteoblastos controles. Si bien los

OBCs tratados con los distintos nucleótidos presentan un perfil de expresión de BMP-6 similar a los controles, se puede ver que el ATP γ S, UDP y ADP β S mostraron los incrementos más importantes en la expresión de esta citocina respecto a los controles. En este caso, el tratamiento con UTP 100 μ M no generó cambios significativos respecto a los controles a los días estudiados.

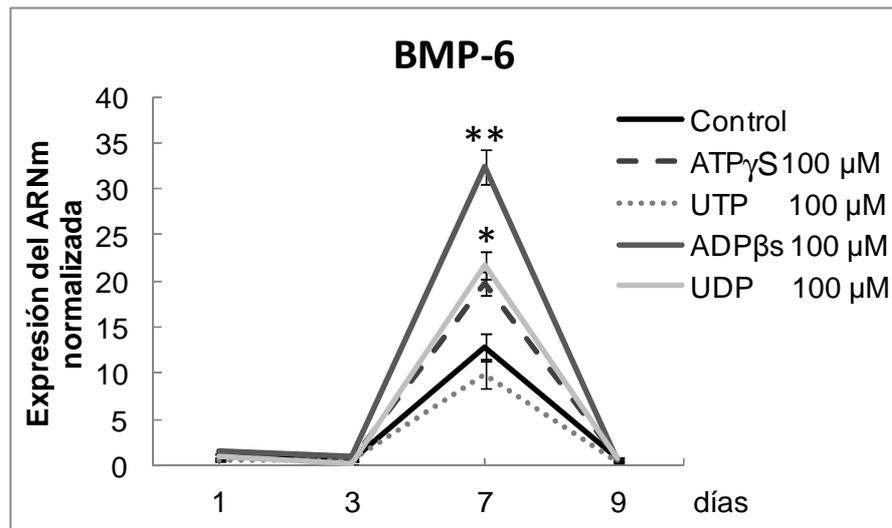


Figura 26. Expresión de BMP-6 en los OBCs luego de estímulos purinérgicos.

Los cultivos de osteoblastos fueron incubados en medio osteogénico en presencia o ausencia de ATP γ S, UTP, ADP β S o UDP 100 μ M durante 1-9 días. Luego estas muestras fueron procesadas como se indica en la Metodología para cuantificar el ADNc correspondiente a la BMP-6 por QRT-PCR. Los gráficos pertenecen a un experimento representativo de tres experimentos individuales procesados por triplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.02$ versus control.

IX-7- Efecto de la estimulación purinérgica sobre la expresión de BMP-7

En la Fig. 27, se puede apreciar que BMP-7 presentó un nivel máximo de expresión génica al día 3 en los OBCs controles, curiosamente fue la única citocina que mostró incrementar mas tempranamente su expresión en los estudios realizados en esta Tesis. En todos los casos, el tratamiento con los nucleótidos incrementó la expresión génica de esta citocina respecto a los

controles al día mencionado, siendo el estímulo más importante (~5 veces sobre los controles) en aquellas células tratadas con ATP γ S.

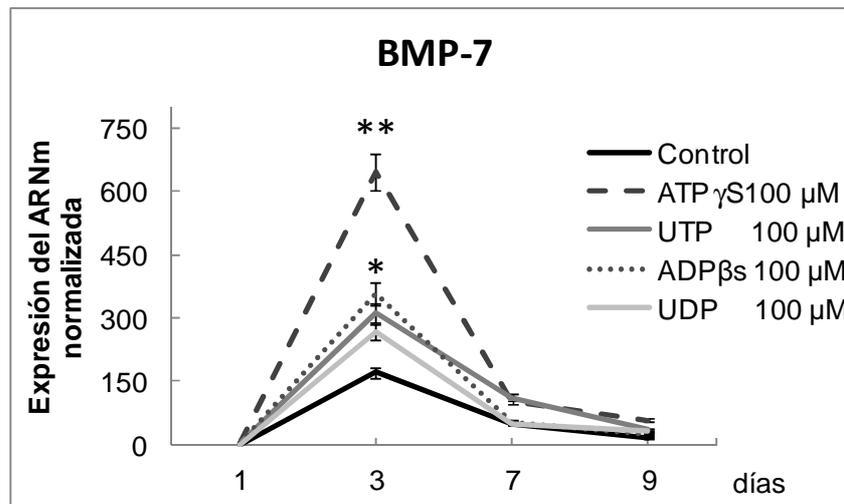


Figura 27. Expresión de BMP-7 en los OBCs luego de estímulos purinérgicos.

Los cultivos de osteoblastos fueron incubados en medio osteogénico en presencia o ausencia de ATP γ S, UTP, ADP β S o UDP 100 μ M durante 1-9 días. Luego estas muestras fueron procesadas como se indica en la Metodología para la cuantificación del ADNc correspondiente a BMP-7 por QRT-PCR. Los gráficos pertenecen a un experimento representativo de dos experimentos individuales procesados por triplicado. *p < 0.05, **p < 0.02 versus control.

Yonezawa y colaboradores (2011) demostraron en cultivos primarios de osteoblastos y células MC3T3 que a partir del día 7 aumenta la expresión de los genes para FAL, BMP-2 y 4 y la mineralización a partir del 14. Del mismo modo, el incremento de BSP y el de proteínas osteogénicas, como BMP-2, -4 y -5, en los controles, sugieren que las condiciones de cultivo utilizadas en esta Tesis, acertadamente promueven la diferenciación y maduración de los osteoblastos.

BMP-2, 4, 5, 6, y 7, tienen una gran capacidad osteogénica. Se ha reportado que la adición de BMP-2 al medio de cultivo es necesaria y suficiente para inducir en forma irreversible la formación ósea (Huang y col., 2010; Noel y col., 2004). Análisis genéticos de los roles de BMP-2 y BMP-4 mostraron que la pérdida de ambos produce defectos en el desarrollo de la osteogénesis (Bandyopadhyay y col., 2006). Ratones carentes de habilidad de producir BMP-

2 sufren fracturas espontáneas que no logran consolidar, sugiriendo que esta citocina es requerida para la reparación del daño óseo (Tsuji y col., 2006). Los estímulos mecánicos pueden promover la diferenciación de los osteoblastos a través de la vía de señalización BMPs/Smad (Wang y col., 2010). Además, se ha reportado que la estimulación mecánica induce la liberación de ATP en distintos tipos de células, incluyendo a osteoblastos (Genetos y col., 2005; Bowler y col., 2001; Gartland y col., 2003). En concordancia con estos datos, uno de los descubrimientos más importantes de esta Tesis es que los agonistas purinérgicos ATP γ S y UTP modulan la expresión génica de BMP-2, BMP-4, BMP-7 y BMP-5 en los osteoblastos de rata a través de los receptores P2Y₂.

Por otro lado, posiblemente la estimulación purinérgica de los receptores P2Y₁, P2Y₆, P2Y_{12, 13} podría estar involucrada en la activación de la cascada intracelular responsable de la expresión de la proteína BMP-1; los receptores P2Y_{1, 4, 6, 12, 13} podrían aumentar la proteína BMP-3, y a tiempos largos parece adquirir importancia el rol desempeñado por P2Y₆; los receptores P2Y_{1, 2, 4, 6, 12, 13} podrían estar involucrados en la activación de la cascada intracelular responsable de la expresión de las proteínas BMP-6.

En general, el tratamiento con los nucleótidos no mostró afectar el patrón temporal de la expresión de las proteínas estudiadas respecto a los controles, puesto que los picos de las condiciones tratadas coincidieron cronológicamente con los controles. Sin embargo, el gran incremento observado en el nivel de expresión de FAL, BSP y proteínas morfogenéticas sugieren que la activación purinérgica, vía receptores P2Y₂, podría mejorar la función y maduración de los osteoblastos.

X- Determinación del efecto de la inhibición de la vía PI3K/AKT sobre los niveles de expresión génica de FAL y BMP-4 por QRT-PCR

Ly294002, inhibidor de PI3K, abolió la proliferación celular y la actividad de FAL inducida por ATP 10 μ M en osteoblastos de calvaria de rata, sugiriendo, que la activación de la vía PI3K/AKT es necesaria para la proliferación y

diferenciación de osteoblastos (Katz y col., 2011). También se demostró que la actividad de FAL inducida por ATP o UTP 100 μ M es suprimida por Ly294002 (Fig. 14). Para corroborar estos datos, se estudió el rol de la vía PI3K/AKT sobre la regulación de la expresión génica de FAL bajo el tratamiento con ATP por QRT-PCR. Para ello, se determinó la expresión de esta enzima, en células tratadas con ATP o UTP en presencia o ausencia del inhibidor de PI3K. Como se puede ver en la Fig. 28A el tratamiento con Ly294002 inhibió fuertemente el incremento inducido por ATP γ S 10 y 100 μ M o UTP 100 μ M en la expresión génica de FAL. Paralelamente, también se estudió la incumbencia de esta vía en la expresión de BMP-4, bajo las mismas condiciones. El tratamiento con Ly294002 también disminuyó, de manera significativa, el aumento de la expresión de BMP-4 inducido por ATP γ S y UTP (Fig. 28B).

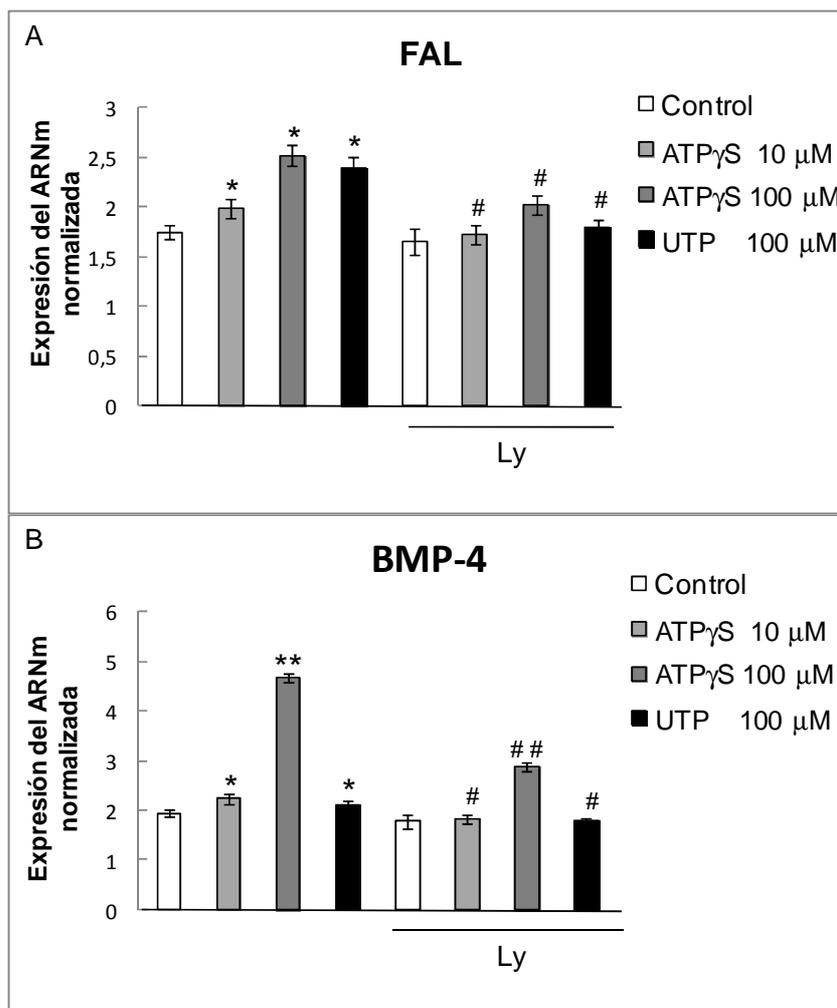


Figura 28. Efecto del LY294002 sobre la expresión de FAL y BMP-4 en los OBCs estimulados con ATP γ S o UTP. Los cultivos de osteoblastos fueron incubados en medio osteogénico con vehículo (control), ATP γ S o UTP a las concentraciones indicadas, en presencia o ausencia de Ly294002 10 μ M (Ly) durante 3 días. Luego estas muestras fueron procesadas como se indica en la Metodología para cuantificar el ADNc correspondiente a (A) FAL o (B) BMP-4 por QRT-PCR. Los niveles de expresión de los genes blanco, fueron normalizados respecto a los controles del día 1. Los resultados se presentan como el promedio \pm DE de tres experimentos individuales procesados por triplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.02$ vs control. # $p < 0.05$, ## $p < 0.02$ vs cada grupo celular sin Ly.

Los resultados de esta Tesis, también sostienen el rol de la vía PI3K/AKT en la modulación por ATP de la expresión génica de FAL y de BMP-4. Además, la modulación de la vía PI3K/AKT por ATP se ha demostrado en varios sistemas (Scodelaro y col., 2010; Katz y col., 2011; Ornelas y ventura, 2010; Horvath y col., 2009; Jacques-Silva y col., 2004). Varias líneas de estudio sugieren que la vía PI3K/AKT juega un rol crucial en la formación y diferenciación de los osteoblastos (Guntur y col., 2012; Yang y col., 2010; Guntur y Rosen, 2011; Mukherjee y Rotwein, 2012). En concordancia con los datos presentados, en células estromales mesenquimales se ha observado una acción concertada entre AKT y BMP-2 en la diferenciación de los osteoblastos (Mukherjee y Rotwein, 2012; Ghosh-Choudhury y col., 2002). Por otro lado, se ha reportado que la vía de señalización de PI3K y su efector AKT interactúa principalmente con los factores de transcripción de los osteoblastos a nivel de la transcripción génica (Fujita y col., 2004; Rached y col., 2010).

Adicionalmente, se sabe que el ATP y UTP extracelular activan el factor de transcripción Runx2, el cual controla la diferenciación celular de los osteoblastos al inducir la expresión de varios genes críticos de este proceso incluyendo la osteopontina, BSP y osteocalcina (Costessi y col., 2005; Ducy y col., 1997; Otto y col., 1997). En relación a esto, aquí se reporta un incremento en la expresión génica de BSP en los osteoblastos tratados con ATP o UTP. BSP se expresa en los osteoblastos maduros, y puede jugar un rol importante en la mineralización ósea (Bianco y col., 1991; Wade-Gueye y col., 2012). Esta

proteína tiene la capacidad de capturar iones de calcio en sus regiones de poliglutamato, las cuales exhiben un potencial de nucleación de cristales de hidroxiapatita (Hunter y Goldberg, 1993).

Los estímulos mecánicos en los osteoblastos han sido asociados con la promoción de la liberación del ATP (Genetos y col., 2005; Bowler y col., 2001; Gartland y col., 2003), así como también con una incrementada actividad de FAL y activación de la vía BMPs/Smad (Wang y col., 2010). Sin embargo, el rol de los nucleótidos extracelulares en la modulación de la expresión génica de las BMPs pudo ser estudiado por primera vez en este trabajo de Tesis.

XI- Infección de los OBCs con MEV

Por otra parte, en este trabajo de Tesis Doctoral se estudió el comportamiento de los OBCs frente a la infección por MEV y JUNV. Dado que hasta el momento no existía un modelo de estudio *in vitro* de la otosclerosis y considerando que esta enfermedad sería aparentemente detonada por la infección con MEV de los huesecillos del oído medio, resultó atractivo el estudio de un sistema virus-célula compuesto por osteoblastos infectados con estos virus, y posteriormente el estudio de la participación de la vía PI3K/AKT, la cual como ya se demostró en esta Tesis es modulada positivamente por el ATP y negativamente por Ly294002.

Por tal motivo y considerando los resultados obtenidos hasta aquí, en lo referente a la diferenciación de los OBCs frente a distintos estímulos, se decidió analizar la interacción de estas células con MEV, putativo agente etiológico de esta enfermedad, a fin de comprobar una respuesta osteogénica de las mismas frente a la infección. Con este propósito, primeramente se procedió a la caracterización de la infección de los OBCs con MEV.

XI-1- Multiplicación de MEV en los OBCs

A fin de analizar la susceptibilidad de los OBCs a la multiplicación de MEV se realizó una curva de multiplicación de este virus en dichas células. Para ello, los OBCs se cultivaron en medio osteogénico (cuya composición se indica en la Metodología), se infectaron con MEV y la infectividad producida en los sobrenadantes se cuantificó por la técnica de UFP en células Vero. Al mismo tiempo, se observaron los cultivos infectados para determinar la producción de efecto citopático (ECP), consecuencia de la multiplicación viral. Cuando se cuantificó la infectividad producida en los sobrenadantes de los OBCs infectados en células Vero por la técnica de UFP se obtuvieron placas definidas y líticas, típicas de este virus en dichas células (Fig. 29).

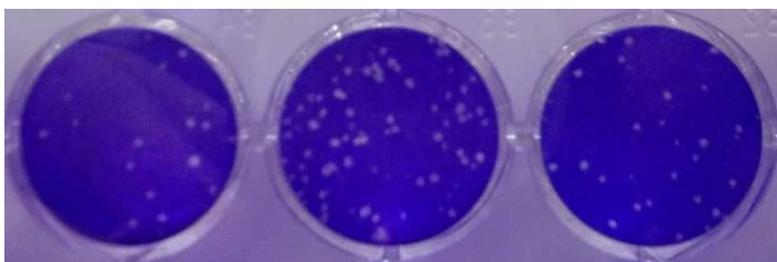


Figura 29. Placas de lisis generadas por MEV en células Vero. Los OBCs fueron infectados con MEV a una m.o.i. de 10^{-2} UFP/célula. Posteriormente, se determinó la infectividad de los sobrenadantes de dichos cultivos por la técnica de UFP en células Vero crecidas en microplacas de 24 cavidades. A los 2 días p.i. se revelaron las placas y se tomaron las fotografías correspondientes.

Con los datos obtenidos de las titulaciones de los sobrenadantes de los cultivos de los OBCs infectados, se construyeron los gráficos de la Fig. 30 que representan las curvas de multiplicación del virus de acuerdo con la m.o.i. utilizada. Como se puede observar, el pico máximo de rendimiento viral se obtuvo al día 2 p.i. en el caso de las m.o.i. de 10^{-2} y 10^{-3} mientras que para la m.o.i. mayor, el máximo título se obtuvo al primer día p.i. (Fig. 30C). Por otro lado, se pudo determinar que los OBCs infectados con MEV presentaron un intenso ECP caracterizado por redondeamiento y desprendimiento de las células de la monocapa, observándose al tercer día p.i. una destrucción total del cultivo. ECP se denomina a todo aquella manifestación anómala, ya sean

cambios bioquímicos, moleculares, morfológicos y/o de viabilidad celular que presenten los cultivos, como producto de la replicación viral. En este caso, el ECP se presentó como una pérdida de la morfología ahusada característica de los osteoblastos, adquiriendo un aspecto globular y refringente para terminar luego con la lisis de la célula y el desprendimiento de la misma al sobrenadante. La intensidad de este proceso es dependiente del tiempo p.i. y de la m.o.i. Dicha lisis justificaría, en parte, la disminución del título viral, dado que a medida que la infección progresa, disminuye la cantidad de células viables productoras de infectividad. En este sistema, el ECP comenzó a hacerse visible al microscopio invertido a partir de las 18 hs p.i. (Fig. 30).

A partir de estos resultados se concluye que los OBCs pueden ser infectados por MEV y que como resultado de la infección se producen niveles de infectividad altos asociados a un ECP intenso. Por ser éste un virus rápido y lítico acota la realización de los experimentos dentro de las 12 hs p.i., dado que MEV realiza un ciclo viral en 16 hs aprox.. Estos resultados representan la primera descripción del sistema OBCs-MEV, sistema que podría ser útil como modelo de estudio de la otosclerosis desde el punto de vista de su componente infeccioso, ya que el MEV podría ser uno de sus probables agentes etiológicos (Niedermayer y col., 2001; Karosi y Sziklai, 2010).

A

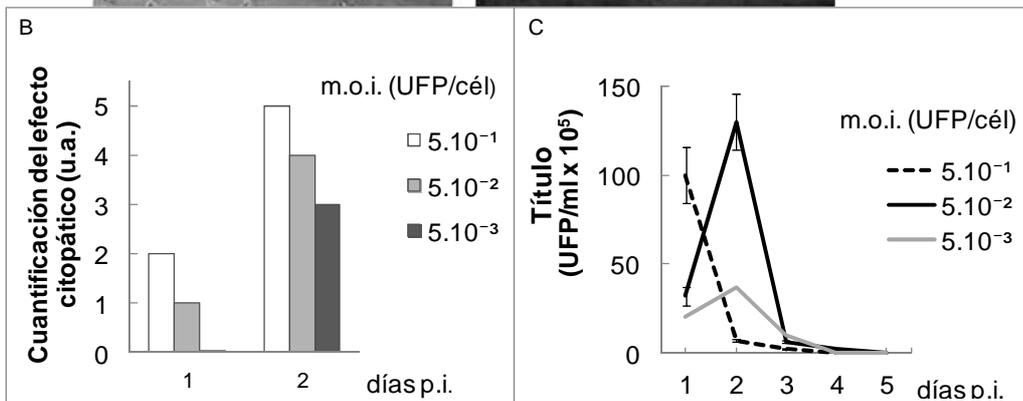
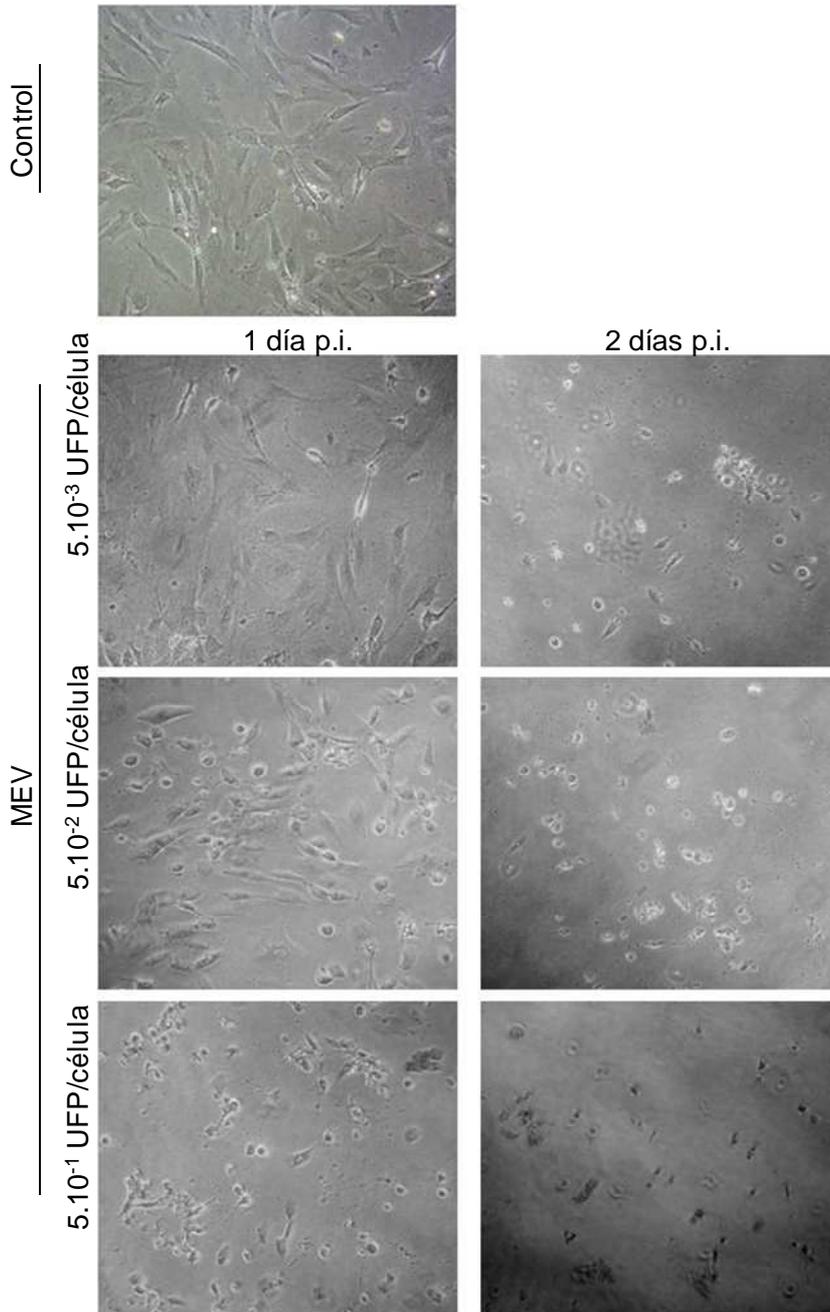


Figura 30. Crecimiento de MEV en los OBCs. (A) Los OBCs fueron infectados con MEV a distintas m.o.i., según se indica en la figura, el mismo día de comienzo del tratamiento con el medio osteogénico y luego se fotografiaron los cultivos controles y los infectados a 1 y 2 días p.i. (B) Valoración arbitraria estimativa del ECP en función del grado de deterioro celular. (C) Curvas de multiplicación de MEV a distintas m.o.i. Los datos pertenecientes a las infecciones con 5×10^{-1} y 5×10^{-2} UFP/cél corresponden al promedio \pm DE de dos experimentos realizados por duplicado, en cambio las cuantificaciones con 5×10^{-3} UFP/cél sólo fueron realizadas una vez.

Las dos glicoproteínas de la envoltura de MEV, llamadas hemaglutinina (H) y proteína de fusión (F), son las responsables de la entrada del virus a la célula. La interacción específica entre H y sus receptores celulares son un paso clave en el éxito de la infección viral. En células humanas han sido bien identificados tres receptores para H dependiendo del tipo celular que se trate; la molécula CD46, la molécula de activación de los linfocitos (SLAM, también llamada CD150) y la molécula de adhesión Nectina-4 (Plempner y col., 2011; Mühlebach y col., 2011; Noyce y col., 2011). SLAM se encuentra expresado en timocitos humanos inmaduros, linfocitos activados, macrófagos y células dendríticas, CD46 se encuentra presente en todos los tipos celulares incluyendo los osteoblastos, salvo en los eritrocitos (Ignatius y col., 2011), y la nectina-4 presente en células epiteliales, diversos cánceres, entre otros (Sato y col., 2012). Se cree que existen otros receptores de anclaje hasta el momento no totalmente caracterizados (Calpe y col., 2008). Sin embargo en modelos animales se sabe muy poco de los posibles receptores que usa MEV. Si bien en muchos casos, la cascada de señalización modulada por un virus comienza con la interacción de la proteína viral anti-receptor con el receptor específico se ha reportado que MEV puede desencadenar varias de sus señales inhibitorias a través del contacto con las balsas de lípidos (lipids rafts) de la membrana plasmática o proteínas inmersas en éstas, sin requerir de CD46 o de SLAM, (Avota y col., 2004; Bretscher y col., 2002; Dunster y col., 1994; Itoh y col., 2002). Específicamente Schneider-Schaulies y col. (1995) han demostrado que existe un bloqueo de la activación de AKT por el sólo contacto con la membrana plasmática de células T. Se sabe que H puede aglutinar eritrocitos

de mono macaco pero no a los del hombre, sin embargo hasta el momento no se sabe cuál es el receptor utilizado en los eritrocitos de macaco (Hashiguchi y col., 2007). Además, en varios estudios realizados en roedores como modelos de la panencefalitis aguda, no se han identificado los receptores específicos para MEV (Moeller y col., 2001; Moeller-Ehrlich y col., 2007). Otros autores, mutaron los sitios de unión de H a CD150 y demostraron que MEV aún podía causar infección sistémica en macacos, sin lograr identificar cual sería el receptor que utiliza en este sistema (Leonard y col., 2008). En este contexto y dado que los osteoblastos no expresan SLAM ni Nectina-4, se podría pensar que los receptores celulares para MEV en los osteoblastos de calvaria de rata, utilizados en esta Tesis, podrían ser los análogos de CD46 presentes en rata y ratón (Mead y col., 1999) o las balsas lipídicas, sin descartar la participación de otros tipos de receptores. Los efectos inducidos por MEV podrían deberse a un estímulo a nivel de membrana y/ o a nivel citoplasmático. En la membrana lo realizaría a través de receptores no identificados, y tras su entrada, en el citoplasma el virus desarrollaría su ciclo de multiplicación explotando la maquinaria celular de acuerdo a la modulación de distintas vías de señalización celular.

XI-2- Modulación génica de proteínas responsables de la diferenciación en los OBCs infectados con MEV

En biopsias de pacientes con otosclerosis se ha reportado un incremento en el nivel de expresión de BMP- 2, 4, 5 y 7 (Csomor y col., 2012). Teniendo en cuenta la probable relación otosclerosis-MEV se decidió estudiar el patrón de expresión de las BMPs y de otros marcadores de diferenciación celular (FAL, BSP y Col1 α 1/2) por técnicas de QRT-PCR, frente a la infección con MEV en medio osteogénico. Como se puede apreciar, en la Fig. 31, en coincidencia con lo reportado, los niveles de BMP-4, 5 y 7 se vieron incrementados por la infección al día 2 de tratamiento en medio osteogénico. Asimismo, resultaron importantes los incrementos observados en los OBCs frente a la infección con MEV de las proteínas BSP y FAL. Se observó también un incremento en la

expresión génica de BMP-1 y 6. BMP-2 y 3 no presentaron diferencias significativas entre los controles infectados respecto a los controles sin infectar. Otras proteínas como Col1 α 1/2 y OPG, indicadores de diferenciación en osteoblastos, también presentaron perfiles diferenciales entre los OBCs no infectados e infectados. De todos ellos, los genes que presentaron cambios más relevantes fueron BMP-4, 5, 6, BSP y FAL (Fig. 31).

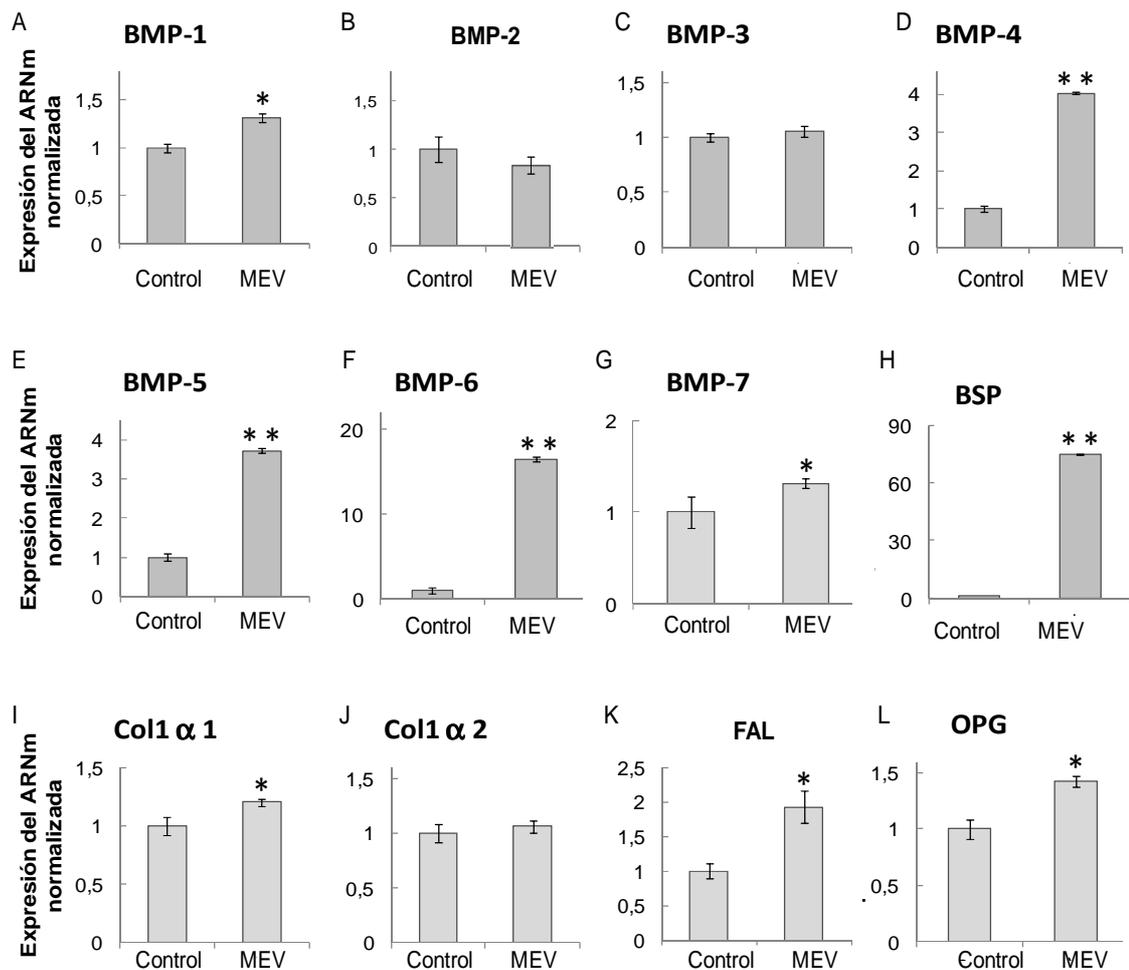


Figura 31. Expresión de diversas proteínas indicadoras de diferenciación en los OBCs infectados con MEV. Los cultivos fueron incubados en medio osteogénico por 2 días y luego fueron infectados con MEV 12 hs antes de cumplirse ese tiempo (MEV) o se dejaron sin infectar (Control). Luego estas muestras fueron procesadas como se indica en la Metodología para proceder a la cuantificación del ADNc correspondiente a los genes indicados en la figura por QRT-PCR. Los resultados se encuentran expresados en unidades arbitrarias y los niveles de expresión de los genes blanco fueron normalizados respecto al control sin infectar del día 2 para cada gen. BMP:

proteína morfogénica ósea, BSP: sialo-proteína ósea, FAL: fosfatasa alcalina, Col1 α 1/2: colágeno tipo 1 alfa1/2, OPG: osteoprotegerina. Los resultados se presentan como el promedio \pm DE de los datos tomados de dos experimentos individuales realizados por triplicado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,02$ vs los controles.

De los genes que presentaron cambios más importantes frente a la infección con MEV, se continuó estudiando a BMP-4, 6, BSP y FAL en función del tiempo. Como se puede observar en la Fig. 32 la infección con MEV estimuló la expresión génica de BMP-4 y 6 en los días 1, 2, 3, y 4 del tratamiento en medio osteogénico respecto a los controles sin infectar. Sin embargo, si bien MEV, produjo estímulos similares, al día 1, 2 y 3 para los genes BSP y FAL, ya al día 4 la expresión génica de éstos, disminuye respecto a las células sin infectar (Fig. 32).

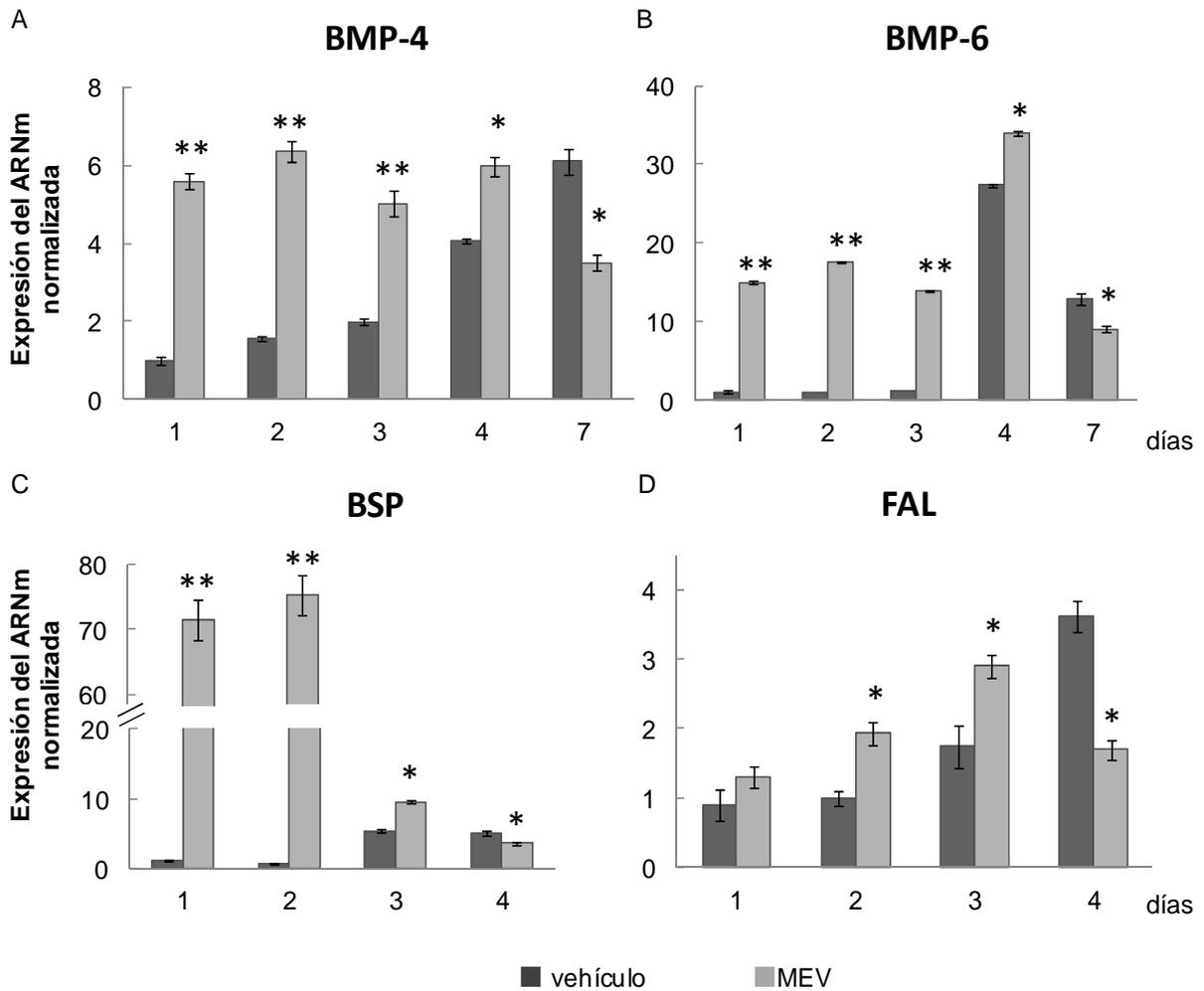


Figura 32. Estudio temporal de la expresión de BMP-4, -6, BSP, y FAL en los OBCs infectados con MEV. Los cultivos fueron incubados en medio osteogénico por 1, 2, 3, 4 y 7 días y luego fueron infectados con MEV (■) 12 hs antes de cumplirse ese tiempo o se mantuvieron sin infectar (■). Luego estas muestras fueron procesadas como se indica en la Metodología para proceder a la cuantificación del ADNc correspondiente a los genes en estudio por QRT-PCR. Los resultados se encuentran expresados en unidades arbitrarias y los niveles de expresión de los genes blanco fueron normalizados respecto al control sin infectar del día 1 para cada gen. Los resultados se presentan como el promedio \pm DE de los datos tomados de dos experimentos individuales realizados por triplicado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,02$ vs controles del mismo día.

De acuerdo con los resultados presentados se puede observar que en los osteoblastos que se encuentran en etapas tempranas de diferenciación, la

infección por MEV acrecienta los niveles BMP-4, -6, BSP, y FAL indicando que, en estos estadios celulares, MEV incrementa la diferenciación de los OBCs, justamente donde los títulos virales fueron mayores, sin embargo en etapas intermedias de diferenciación (4-7 días) MEV inhibe la diferenciación de los osteoblastos al reducir la expresión génica de estas proteínas, alimentando la hipótesis de que el sistema celular de osteoblastos inmaduros es el de preferencia para estos virus.

Es importante señalar que varios estudios previos demuestran que existe una asociación entre la alteración de los patrones normales de expresión de las BMPs y la infección por MEV en diversos sistemas celulares. Se sabe que los astrocitos incrementan la expresión de varios genes, dentro de ellos BMP-2 y BMP-3, luego de estímulos proinflamatorios (Meeuwsen y col., 2003). Como ejemplo de estímulo proinflamatorio podemos mencionar la infección por MEV en el sistema nervioso central, en la panencefalitis subaguda esclerosante que es una encefalitis crónica que está dada por la infección persistente de MEV en el cerebro (Hirano, 1992).

Se sabe que los integrantes de la familia TGF- β (dentro de ellos las BMPs), además de su acción sobre los osteoblastos, regulan la respuesta inmune innata frente a múltiples infecciones mediante la modulación de la inflamación, controlan la apoptosis celular inducida por la infección viral, y la replicación de diversos virus tales como poliomavirus (Abend y Imperiale, 2008), reovirus (Beckham y Parker, 2008; Beckham y col., 2009), VIH (Cotter y col., 2008; Enam y col., 2004), virus epstein barr (Fukuda y col., 2001), virus de la hepatitis C (Huang y col., 2007), herpes simplex tipo I (Hamza y col., 2007; Calabrese y col., 2013), herpes simplex tipo 2 (Gridley y col., 1993), etc. Se ha demostrado que existe una correlación entre el patrón de las BMP-2, 4, 5 y 7, que se encuentra alterado, y el grado de avance de la otosclerosis en los cortes histológicos de pacientes afectados (Lehnerdt y col., 2008; Csomor y col., 2012; Schrauwen y col., 2008; Liu y col., 2007), coincidiendo con los resultados de esta Tesis para BMP-4, 5 y 7.

Es importante resaltar que existe una asociación entre la otosclerosis y mutaciones en el gen para el Colágeno1 α 1 (McKenna y col., 1998) e incrementos en la expresión de FAL (Karosi y col., 2006), como así también, un

aumento en los niveles de expresión de OPG (Stankovic y col., 2010; Zehnder y col., 2005), coincidiendo con lo observado en esta Tesis en los OBCs infectados por MEV. En función de estos antecedentes y los resultados expuestos, este sistema de estudio, en etapas tempranas de diferenciación de los OBCs, sería por lo tanto un excelente modelo de investigación para esta enfermedad. Por tales motivos, resulta interesante especular acerca de la utilidad de la determinación del incremento de estas proteínas, como parámetro utilizado en el diagnóstico precoz de la otosclerosis incluso antes de la pérdida total de la audición del paciente, lo que podría evitar la remoción de la cápsula ótica y el uso de prótesis.

XI-3- Modulación de la respuesta celular en osteoblastos infectados con MEV en presencia de estímulos purinérgicos

Del mismo modo que se estudiaron los efectos de los agonistas purinérgicos en los OBCs sin infectar, a continuación se presentan los resultados obtenidos en el caso de células infectadas.

XI-3-a- Efecto de la estimulación purinérgica sobre el rendimiento viral en los OBCs infectados con MEV

En primer lugar se determinó el rendimiento viral en los OBCs tratados con ATP γ S, UTP, ADP β S o UDP a concentraciones de 10 μ M frente a la infección con MEV en medio osteogénico (Fig. 33). Los datos obtenidos muestran que, en los OBCs tratados con ATP γ S o ADP β S 10 μ M disminuyó el rendimiento viral durante todos los tiempos ensayados respecto a los controles (infectados pero sin tratar), lo que sugiere un rol importante de los receptores purinérgicos, especialmente los P2Y_{1, 12, 13} en la multiplicación de MEV. Sin embargo, estos tratamientos no incrementaron la supervivencia de los OBCs frente a la infección con MEV, dado que, luego de los 3 días p.i., todos los cultivos mostraron un ECP marcado y luego de los 5 días p.i. la viabilidad celular resultó nula (Fig. 33). Tomando como base que el tratamiento con ATP mostró

incrementar la diferenciación de los OBCs involucrando a la vía de señalización de la PI3K/AKT, como se muestra en la sección X y en trabajos previos con la línea celular osteoblástica ROS17/2.8 (Katz y col., 2011), estos resultados pueden ser explicados en base al trabajo de Carsillo y colaboradores, pues ellos demuestran que, *in vitro*, la sobreexpresión de AKT no influye en la replicación de MEV, pero sí afecta la liberación del mismo (Carsillo y col., 2010).

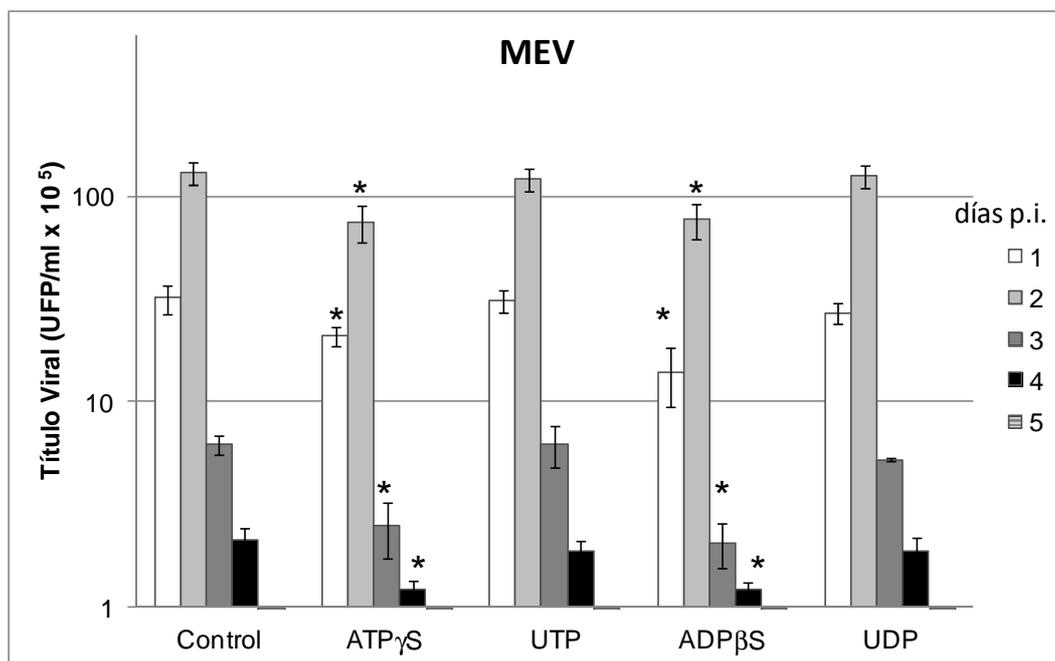


Figura 33. Crecimiento de MEV en los OBCs infectados y tratados con agonistas purinérgicos. Los cultivos fueron infectados con una m.o.i. de 10^{-2} UFP/célula el mismo día de comienzo del tratamiento con ATP γ S, UTP, ADP β S o UDP 10 μ M, luego los sobrenadantes fueron recolectados a los días p.i. que se indican en la figura para su posterior titulación. Los datos obtenidos corresponden a los promedios \pm DE de dos experimentos realizados por duplicado. * $p < 0,05$ vs control de cada día.

De la misma manera se determinó el título viral en los sobrenadantes de los OBCs infectados con MEV y tratados con ATP 100 μ M (Fig. 34), demostrando, también, una disminución del título viral en los OBCs tratados con ATP respecto a los controles.

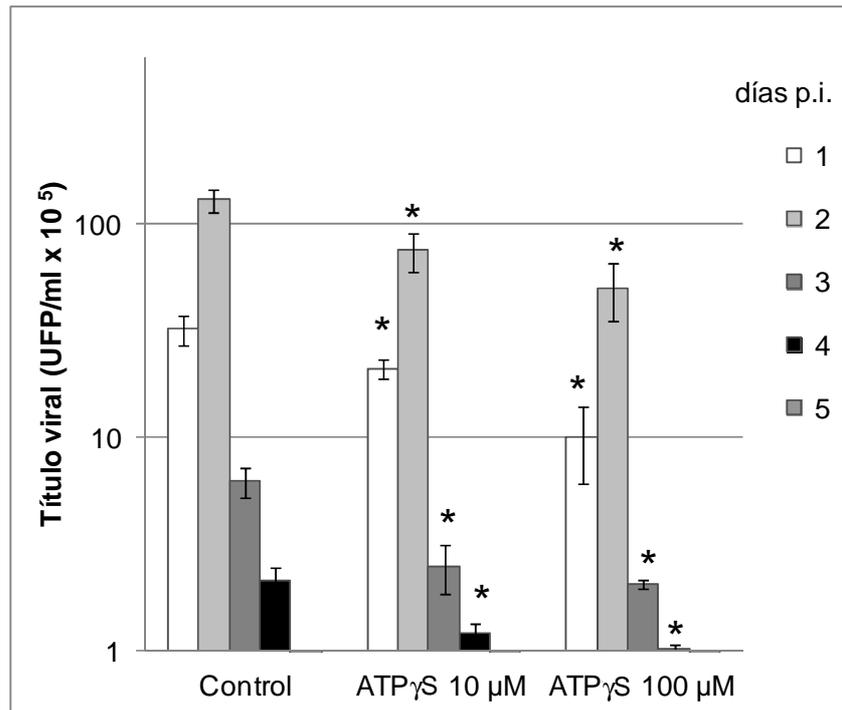


Figura 34. Crecimiento de MEV en los OBCs tratados con ATP γ S. Los cultivos fueron infectados con una m.o.i. de 10^{-2} UFP/célula el mismo día de comienzo del tratamiento con ATP γ S 10 y 100 μ M, luego los sobrenadantes fueron recolectados a los días p.i. que se indican en la figura para su posterior titulación. Los gráficos de barras representan los promedios \pm DE correspondientes a dos experimentos realizados por duplicado. * $p < 0,05$ vs el control de cada día.

XI-3-b- Modulación génica de las BMPs, en los OBCs infectados con MEV

Se evaluaron los niveles de expresión de los 12 genes estudiados en la Fig. 31, en presencia de estímulos purinérgicos al día 2 de tratamiento en medio osteogénico en células infectadas con MEV (Fig. 35 y 36).

En la Fig. 35 se pueden observar los efectos generados sobre diferentes BMPs en los OBCs tratados con ATP γ S 10 μ M e infectados con MEV. Como se puede ver en la figura, al día 2, la infección de las células con MEV incrementó la expresión de BMP-1, 4, 5, 6 y 7 respecto a los controles no infectados (ver barras grises de las Fig. 37A, D, E, F y G), contrariamente, BMP-2 y BMP-3 permanecieron sin cambios en las condiciones de infección respecto a las de sin infectar. Por otro lado, el tratamiento con ATP γ S 10 μ M en los OBCs sin

infectar solo resultó ser suficiente para incrementar la expresión de BMP-1 y 2 por sobre los controles al día 2 de tratamiento (Fig. 35A y B). Sin embargo, los niveles de expresión de BMP-1 en presencia de ATP γ S 10 μ M en los OBCs infectados con MEV resultaron ser similares a los de los OBCs sin infectar, sugiriendo que el estímulo generado por MEV sobre BMP-1 podría estar dado por una vía alterna que compita con la vía estimulada por el ATP, o viceversa (Fig. 35A). Además, en la Fig. 35C y G se puede ver que el tratamiento con ATP 10 μ M en los OBCs infectados con MEV inhibió el efecto generado, sobre la expresión génica de BMP-3 y BMP-7, por sobre los controles sin infectar, esto podría estar explicado por algún tipo de competencia o bloqueo de las vías involucradas en la expresión de estas BMPs en la condición MEV+ATP 10 μ M. Por otro lado la Fig. 35F muestra que tanto MEV como la condición MEV+ATP generaron un incremento de los niveles de expresión génica de BMP-6, lo que indicaría que los efectos generados por MEV y ATP sobre esta citocina parecerían ser aditivos.

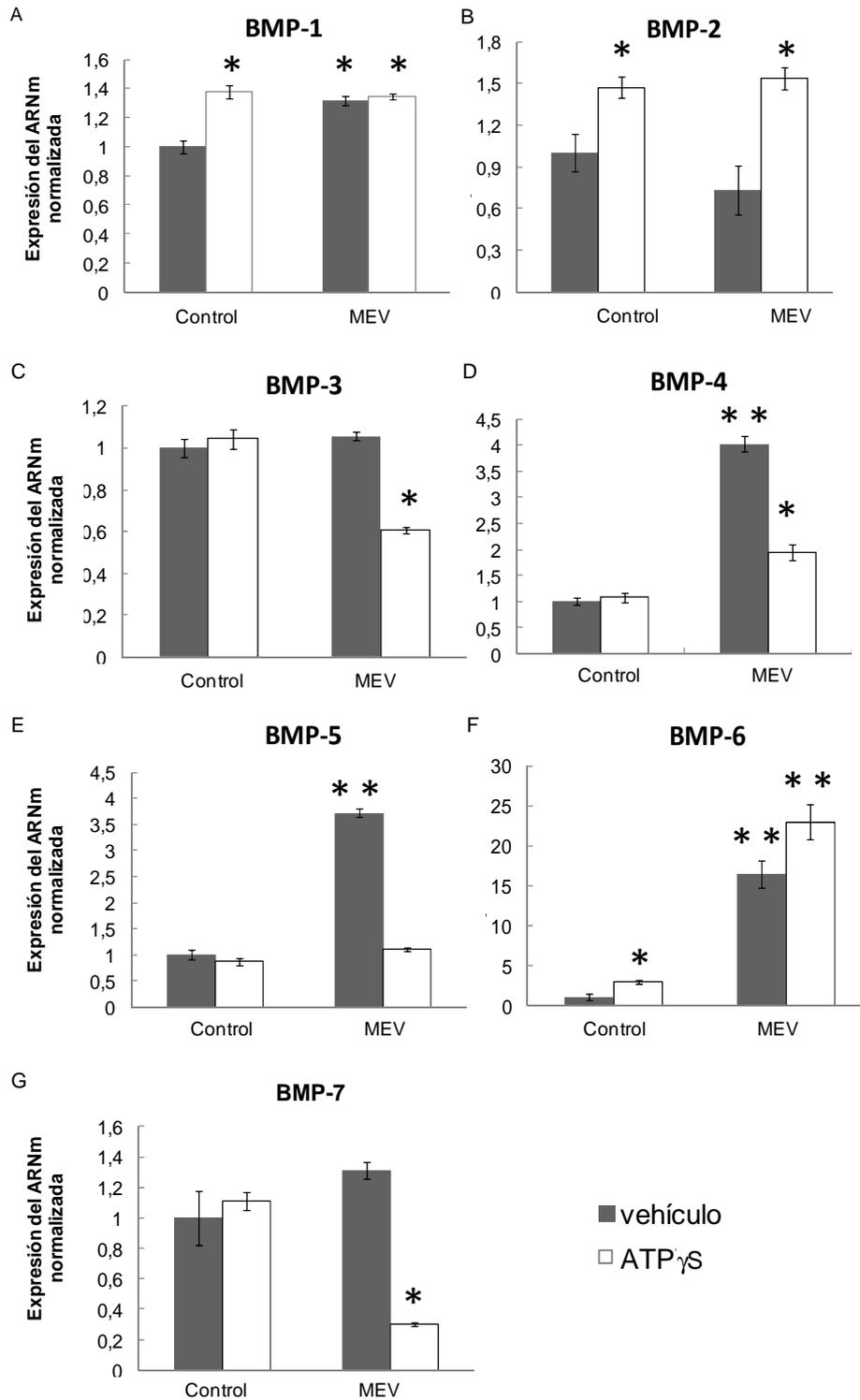


Figura 35. Expresión de diversas BMPs en los OBCs infectados con MEV en presencia de ATP γ S. Los cultivos fueron incubados en medio osteogénico por 2 días en presencia de ATP γ S 10 μ M (□) o vehículo (■) y luego fueron infectados con MEV 12 hs antes de cumplirse ese tiempo (MEV) o se dejaron sin infectar (Control). Luego estas muestras fueron procesadas como se indica en la Metodología para proceder a la cuantificación del ADNc correspondiente a los genes indicados en la figura por QRT-

PCR. Los resultados se encuentran expresados en unidades arbitrarias y los niveles de expresión de los genes blanco fueron normalizados respecto al control sin infectar del día 2 para cada gen. Los resultados se presentan como el promedio \pm DE de los datos tomados de dos experimentos individuales realizados por triplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.02$ vs condición control.

De igual manera se realizaron estudios en presencia de UTP 10 μ M, principal agonista de los receptores P2Y₂ y P2Y₄. Como se puede ver en la figura, los perfiles de las BMPs obtenidos en presencia de UTP en los OBCs infectados tienen un comportamiento similar a los tratados con ATP (Fig. 37), con la salvedad que BMP-7 presenta niveles de expresión génica similares en las condiciones Control + vehículo respecto a la condición MEV con o sin UTP.

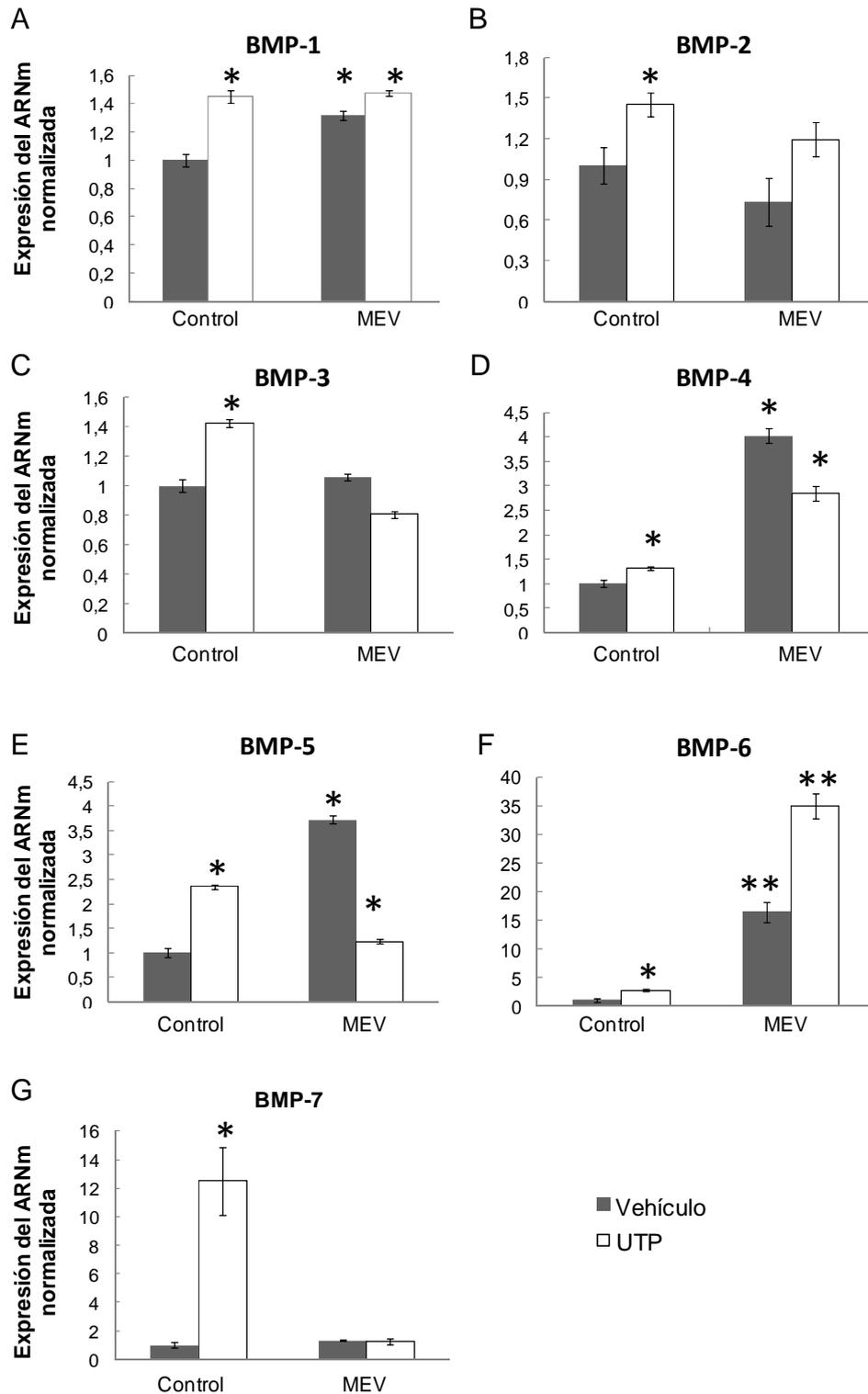


Figura 36. Expresión de diversas BMPs en los OBCs luego de la infección con MEV en presencia de UTP. Los OBCs se incubaron en medio osteogénico por 2 días en presencia de UTP 10 μ M (□) o vehículo (■). Posteriormente se infectaron con MEV 12 hs antes de cumplirse ese tiempo (MEV) o se dejaron sin infectar (control). Luego estas muestras fueron procesadas como se indica en la Metodología para proceder a

la cuantificación del ADNc correspondiente a los genes indicados en la figura por QRT-PCR. Los resultados se encuentran expresados en unidades arbitrarias y los niveles de expresión de los genes blanco fueron normalizados respecto al control sin infectar del día 2 para cada gen. Los resultados se presentan como el promedio \pm DE de los datos tomados de dos experimentos individuales realizados por triplicado.

De las Fig. 35 y 36 se puede concluir que los receptores purinérgicos, principalmente P2Y₂ cumplen un rol muy importante en la respuesta génica de las BMPs frente a la infección con MEV. La modulación génica de estas proteínas podría ser útil a la hora de diseñar un tratamiento farmacológico para diversas enfermedades óseas como la otosclerosis.

XI-3-c- Determinación de diversas proteínas indicadoras de diferenciación osteoblástica por QRT-PCR

Para analizar el efecto de los nucleótidos sobre la diferenciación de los OBCs y poder así asociarlo con los cambios observados en las distintas BMPs, se estudió por QRT-PCR la modulación de la expresión de proteínas asociadas a la diferenciación osteoblástica luego de la estimulación con los distintos nucleótidos durante los tiempos indicados en presencia y ausencia de infección viral.

En las Fig. 37 y 38 se pueden observar los efectos generados sobre diversas proteínas indicadoras de diferenciación osteoblástica en los OBCs infectados con MEV en presencia de ATP γ S (Fig. 37) o UTP (Fig. 38) 10 μ M. Como se puede ver en la Fig. 37 y 38A, D y E, el tratamiento con ATP o UTP 10 μ M inhibe el efecto generado por MEV sobre la expresión génica de BSP, FAL y OPG, esto podría estar explicado por algún tipo de competencia o bloqueo de las vías involucradas en la expresión de estas proteínas bajo estas condiciones. Por otro lado, los niveles de expresión de Col1 α 2 permanecen sin ser afectados en presencia de infección viral, inclusive en la condición que se adicionan nucleótidos, respecto a los controles (Fig. 37 y 38B y C).

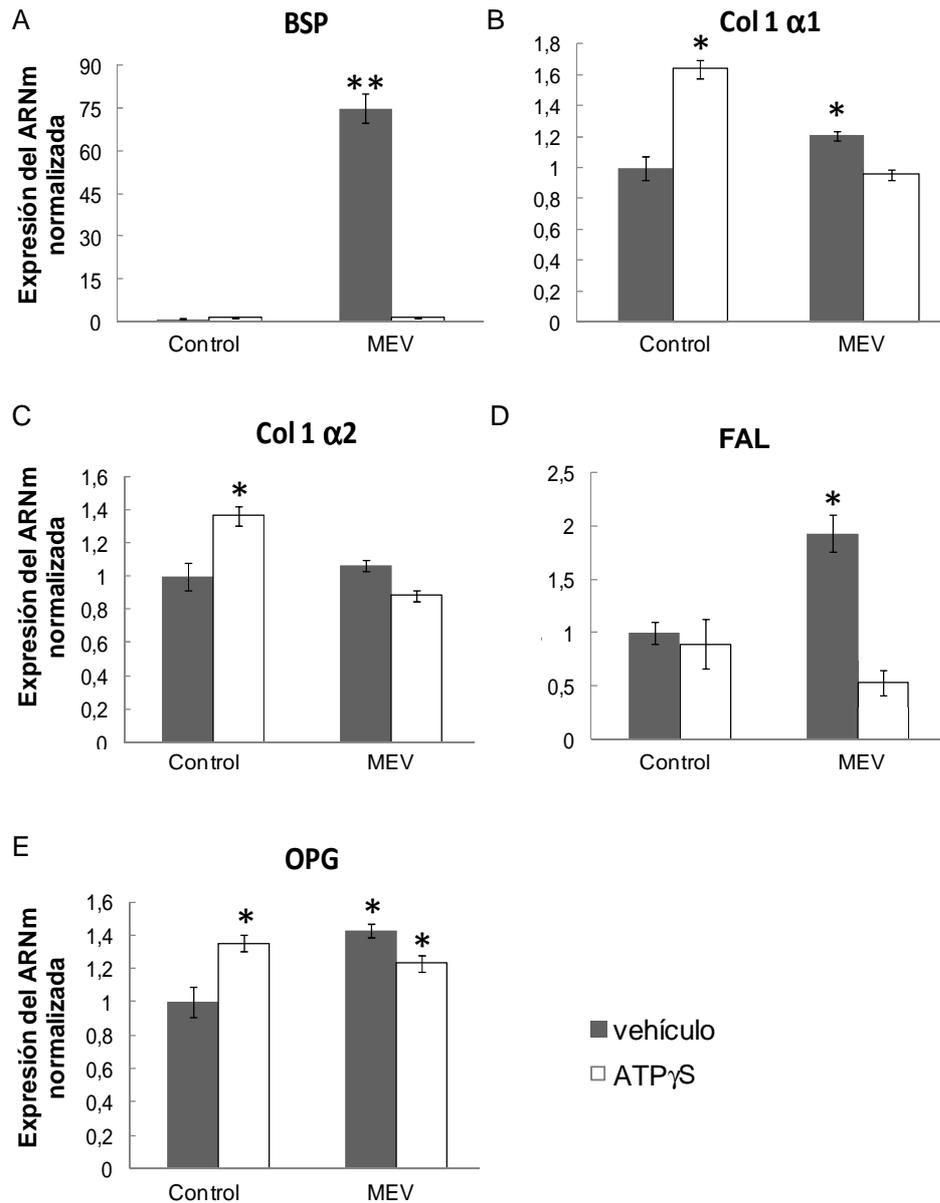


Figura 37. Expresión de diversas proteínas indicadoras de diferenciación de osteoblastos en los OBCs infectados con MEV tratados con ATP γ S. Los OBCs fueron incubados en medio osteogénico por 2 días en presencia de ATP γ S 10 μ M (□) o vehículo (■) y luego fueron infectados con MEV 12 hs antes de cumplirse ese tiempo (MEV) o se dejaron sin infectar (Control). Luego estas muestras fueron procesadas como se indica en la Metodología para proceder a la cuantificación del ADNc correspondiente a los genes indicados en la figura por QRT-PCR. Los resultados se encuentran expresados en unidades arbitrarias y los niveles de expresión de los genes blanco fueron normalizados respecto al control sin infectar del día 2 para cada gen. Los resultados se presentan como el promedio \pm DE de los datos tomados de dos experimentos individuales realizados por triplicado.

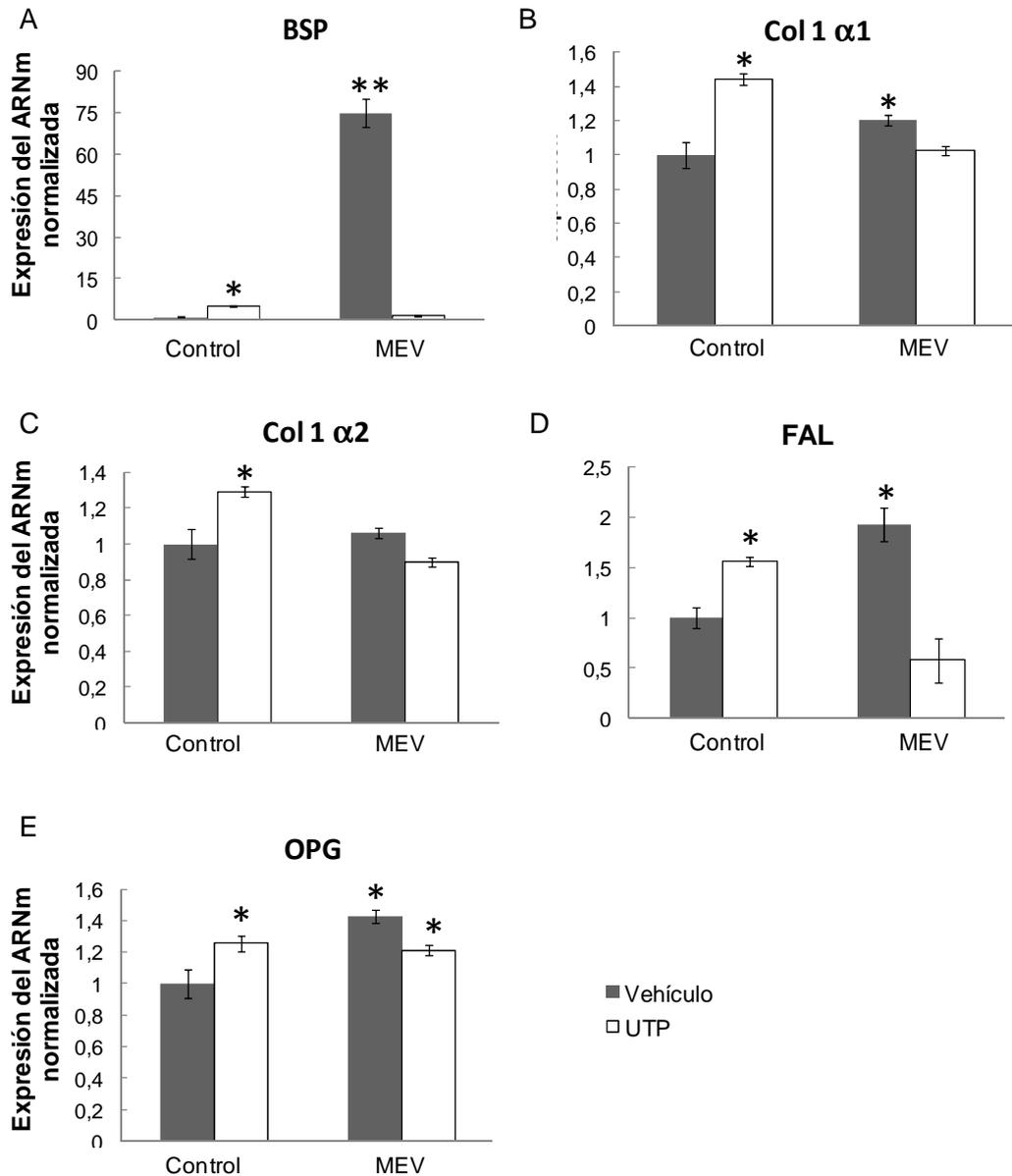


Figura 38. Expresión de diversas proteínas indicadoras de diferenciación de osteoblastos infectados con MEV tratados con UTP. Los OBCs fueron incubados en medio osteogénico por 2 días en presencia de UTP 10 μ M (□) o vehículo (■) y luego fueron infectados con MEV 12 hs antes de cumplirse ese tiempo (MEV) o se dejaron sin infectar (Control). Luego estas muestras fueron procesadas como se indica en la Metodología para proceder a la cuantificación del ADNc correspondiente a los genes indicados en la figura por QRT-PCR. Los resultados se encuentran expresados en unidades arbitrarias y los niveles de expresión de los genes blanco fueron normalizados respecto al control sin infectar del día 2 para cada gen. Los resultados se presentan como el promedio \pm DE de los datos tomados de dos experimentos individuales realizados por triplicado.

XI-4- Rol de la vía PI3K/AKT sobre la respuesta celular en los OBCs infectados con MEV en presencia de estímulos purinérgicos

De acuerdo a los resultados mostrados en la Fig. 32, se eligió al día 3 como día de estudio frente al tratamiento con los nucleótidos, en este caso ATP γ S, para determinar el rol que desempeña la vía PI3K/AKT en este tipo de infección (Fig. 39). Para determinar si MEV genera los incrementos génicos a través de la vía PI3K/AKT, se realizaron los estudios en presencia de Ly294002 (inhibidor de PI3K).

Como se describió anteriormente (Fig. 28 de esta Tesis), el tratamiento con ATP γ S a concentraciones 10 o 100 μ M estimuló la expresión génica de BMP-4 y FAL siendo más importante el incremento con la concentración de 100 μ M, por tal motivo se eligió esta concentración para el estudio de inhibición farmacológica con Ly294002 (Fig. 39).

En la Fig. 35A se observa que la infección con MEV incrementó la expresión génica de BMP-4 en 2,5 veces respecto a los controles del día 3. Por otro lado el estímulo de ATP γ S 100 μ M también incrementó la expresión génica de BMP-4 a niveles comparables con lo que ocurre con MEV. Sin embargo en la condición en la cual se realizó el tratamiento con ATP γ S 100 μ M en presencia de MEV, el estímulo no resultó ser aditivo. A la derecha, de la Fig. 39A, se presentan las condiciones en presencia de Ly294002. Como se puede observar el estímulo generado por ATP γ S es dependiente de la vía PI3K/AKT, ya que el inhibidor es capaz de inhibir el estímulo. Sin embargo el estímulo inducido por MEV no dependería de dicha vía, lo que se puede comprobar observando las dos últimas barras de la Fig. 39A. En la Fig. 39B se observa que MEV también logró estimular la expresión génica de la FAL independientemente de la vía PI3K/AKT ya que su efecto no se ve modificado por el tratamiento con Ly294002. Se ha reportado una regulación negativa en la fosforilación de AKT inducida por MEV en células Vero (Carsillo y col., 2010). Esto permite especular que la infección con MEV estimularía la expresión génica de BMP-4 y FAL por una vía alterna a la vía PI3K/AKT, MEV podría entonces bloquear dicha vía y aún así estimular la expresión génica de BMP-4 o FAL.

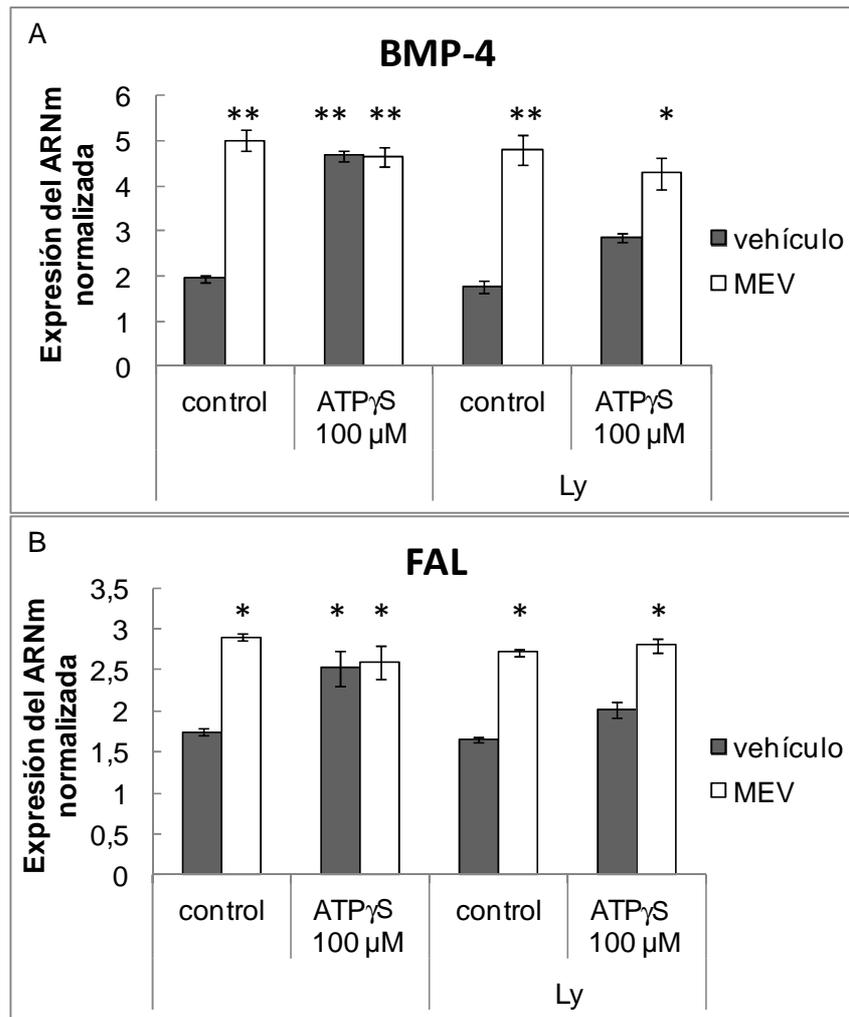


Figura 39. Expresión de BMP-4 y FAL en los OBCs infectados con MEV en presencia de ATP γ S. Los cultivos de los osteoblastos fueron incubados en medio osteogénico por 3 días con o sin tratamiento con ATP γ S 100 μ M en presencia o ausencia de Ly294002 (Ly), y luego fueron infectados con MEV (\square) 12 hs antes de cumplirse ese tiempo o se dejaron si infectar (\blacksquare). Posteriormente estas muestras fueron procesadas como se indica en la Metodología para proceder a la cuantificación del ADNc correspondiente a los genes indicados en la figura por QRT-PCR. Los resultados se encuentran expresados en unidades arbitrarias y los niveles de expresión de los genes blanco fueron normalizados respecto al control sin infectar del día 1 para cada gen. Los resultados se presentan como el promedio \pm DE de los datos tomados de dos experimentos individuales realizados por triplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.02$ vs condición control sin Ly.

Por otro lado se determinó el grado de compromiso del rendimiento viral en presencia del inhibidor de la vía PI3K/AKT (Fig. 40).

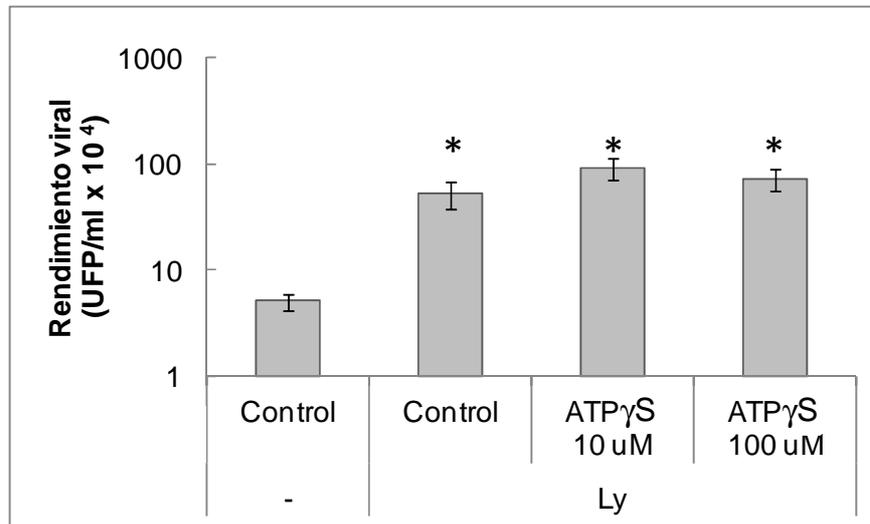


Figura 40. Crecimiento de MEV en los OBCs tratados con ATP γ S y el inhibidor de la vía PI3K/AKT. Los cultivos fueron tratados con ATP γ S 10 y 100 μ M, en presencia o ausencia de Ly 294002 10 μ M (Ly) o el vehículo (-), en medio osteogénico, por 3 días. 12 hs antes de cumplido este tiempo fueron infectados con MEV a una m.o.i. de 10^{-2} UFP/célula, luego los sobrenadantes fueron recolectados para su posterior titulación. * $p < 0.05$ vs condición control sin Ly.

Como se puede observar en la Fig. 40, el compuesto Ly294002 estimuló la replicación de MEV en los OBCs, indicando que el bloqueo de la vía PI3K/AKT sería importante para la replicación de este virus.

Avota y col., (2004 y 2001) demostraron que las glicoproteínas de MEV al interaccionar con los receptores celulares específicos inhiben la proliferación en células T al interferir en la señalización de la vía PI3K/AKT. Estos resultados pueden ser explicados tomando como base el trabajo de Carsillo y col., en donde demuestran que si bien la sobreexpresión de AKT no influye en la replicación de MEV, sí afecta la liberación del mismo *in vitro* (Carsillo y col., 2010). Avota y col., (2001) postulan que MEV no sólo no estimula AKT sino que además reduce la expresión de su forma forforilada luego de la infección, en cambio Moss y colaboradores (2004) lo explican desde una inhibición de la

fosforilación y bloqueo de la traslocación de STAT al núcleo, del bloqueo de respuestas generadas a través de AKT, de la modulación de NF- κ B y del bloqueo de la progresión del ciclo celular. Todos los estudios realizados hasta el momento indican que MEV interferiría en la vía PI3K/AKT y el ciclo celular para inducir apoptosis, aunque se desconoce el mecanismo. Por otro lado, se sabe que MEV utiliza proteínas quinasas celulares para fosforilar residuos serina de la proteína P viral (Das y col., 1995), residuos serina/treonina de la N para favorecer la replicación (Devaux y col., 2007; Robbins y col., 1980) y residuos tirosina de N y P (Segev y col., 1995; Ofir y col., 1996). La fosforilación de residuos serina de N activa la transcripción y replicación de MEV (Hagiwara y col., 2008). Por todo ello, estos estudios sugieren que posiblemente MEV no utilice AKT (que es una serina/treonina quinasa) para fosforilar a sus proteínas virales como P y N, aunque sí podría utilizar a las proteínas que fosforilan a AKT para incrementar su replicación viral, interfiriendo así con los mecanismos controlados por la vía PI3K/AKT ya demostrados en esta Tesis.

XII- Infección de los OBCs con JUNV

XII-1- Caracterización de los OBCs infectados con JUNV

A fin de analizar si la respuesta de diferenciación de los OBCs frente a la infección con MEV se limitaba a este tipo de virus en particular, se procedió a caracterizar la infección de JUNV en dichas células. Las mismas fueron mantenidas en medio osteogénico, se infectaron a una m.o.i. de 10^{-1} UFP/célula y la infectividad producida en los sobrenadantes se cuantificó por la técnica de UFP. Se pudo identificar el tipo de placas generadas, siendo las mismas redondeadas, de aspecto difuso y de menor tamaño que las obtenidas con MEV (Fig. 41).

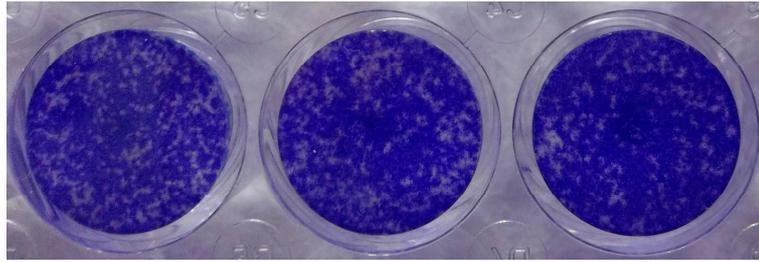


Figura 41. Placas de lisis generadas por JUNV en células Vero. Los osteoblastos fueron infectados con JUNV a una m.o.i. de 10^{-1} UFP/célula. Posteriormente, se determinó la infectividad de los sobrenadantes de dichos cultivos por la técnica de UFP en células Vero crecidas en microplacas de 24 cavidades. A los 7 días p.i. se revelaron las placas y se tomaron las fotografías correspondientes.

Con los datos obtenidos de las titulaciones virales se construyó el gráfico de la Fig. 42, que representa la curva de multiplicación de JUNV en los OBCs. Como se puede observar en dicha figura, los OBCs infectados con JUNV presentaron títulos más bajos que los infectados con MEV, $1,45 \pm 0,5 \times 10^5$ vs $130 \pm 19 \times 10^5$ UFP/ml respectivamente (ver Fig. 30). Sin embargo, el pico máximo de rendimiento viral se obtuvo al día 2 p.i. para ambos virus.

A diferencia de la infección con MEV, los OBCs infectados con JUNV no mostraron ECP y resultaron morfológicamente indistinguibles de los controles sin infectar.

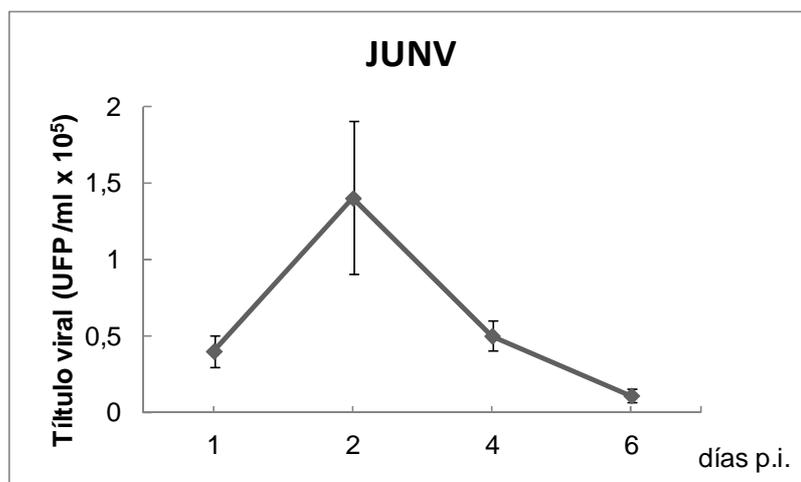


Figura 42. Crecimiento de JUNV en los OBCs. Los OBCs se infectaron con JUNV a una m.o.i. de 10^{-1} UFP/célula, el mismo día de comienzo del tratamiento. Los datos se

encuentran expresados como UFP/ml $\times 10^5$. Los desvíos corresponden a tres experimentos realizados por duplicado.

XII-2- Análisis de la expresión de la proteína N de JUNV en los OBCs

Si bien la producción de infectividad resultó un claro indicio de infección en los OBCs, se corroboró dicha situación realizando sobre estos cultivos un análisis de expresión de la nucleoproteína viral, N, mediante las técnicas de IFI y WB a los 7 días p.i.. Como se puede observar en la Fig. 43, los OBCs infectados presentaron un patrón de fluorescencia citoplasmática granular similar a lo observado para la infección de células Vero (Ellenberg y col., 2007). La presencia de N también se confirmó mediante WB en donde se apreció una banda intensa de 65 kDa correspondiente a dicha proteína (Fig. 43). Estos resultados demuestran que los OBCs, del mismo modo que resultó con MEV, fueron susceptibles a la infección con JUNV, aunque este último no produjo un ECP visible en estas células.

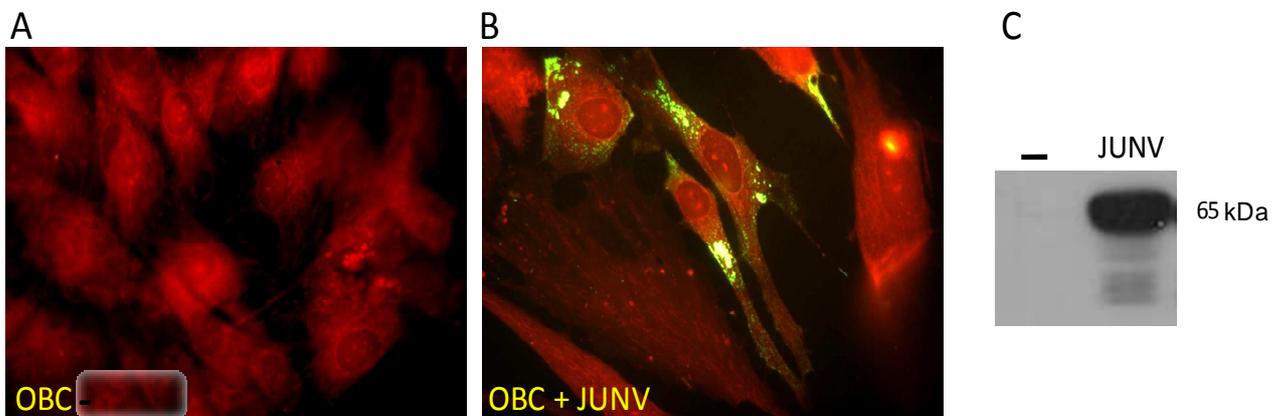


Figura 43. Determinación de la proteína N. Inmunofluorescencia de los OBCs previo (A) y 7 días p.i. con JUNV a una m.o.i. de 10^{-1} UFP/célula (B) y su correspondiente WB (C) indicando el peso molecular de la proteína N. (-): OBCs sin infectar; JUNV: OBCs infectados con JUNV. Aumento 400X.

XII-3- Sistema OBCs-JUNV como potencial modelo de infección persistente en los osteoblastos

El hecho de que JUNV no provocara un ECP apreciable en los OBCs permitió analizar el sistema virus-célula a tiempos prolongados p.i.. Se determinó que los OBCs infectados con JUNV son capaces de proliferar durante períodos prolongados sin presentar alteraciones morfológicas respecto de los controles no infectados. Es así que luego de más de dos meses de iniciada la infección, los cultivos infectados resultaron indistinguibles de los OBCs controles (Fig. 44). Esta observación permite especular acerca de la utilidad de JUNV como modelo de estudio de infecciones persistentes en osteoblastos, como ocurre en el caso de la otosclerosis.

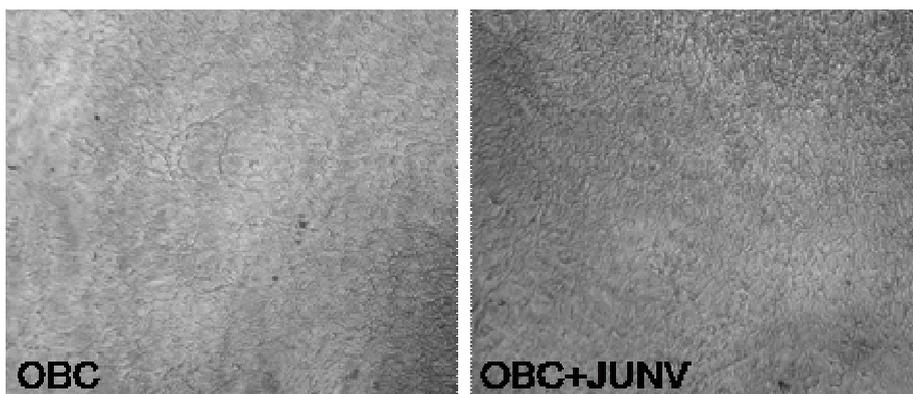


Figura 44. Infección con JUNV en los OBCs. Los OBCs se infectaron con JUNV a una m.o.i. de 10^{-1} UFP/célula al inicio del tratamiento con medio osteogénico (OBC+JUNV) o se dejaron sin infectar (OBC) y se mantuvieron durante más de 70 días, por repiques sucesivos para luego ser fotografiados. Aumento 100X.

XII-4- Respuesta de los OBCs infectados con JUNV frente a los tratamientos con agonistas purinérgicos

Del mismo modo que se planteó en el caso de MEV, se analizó la influencia de la infección con JUNV sobre la respuesta de los OBCs frente a la presencia de estímulos purinérgicos. En primer lugar se determinó el rendimiento viral en los OBCs infectados y tratados con ATP γ S, UTP, ADP β S, o UDP a

concentraciones de 10 μ M en medio osteogénico (Fig. 45). De los valores volcados al gráfico se observa que, los tratamientos con los nucleótidos no modificaron de manera significativa el título viral de los cultivos infectados respecto del control sin tratar.

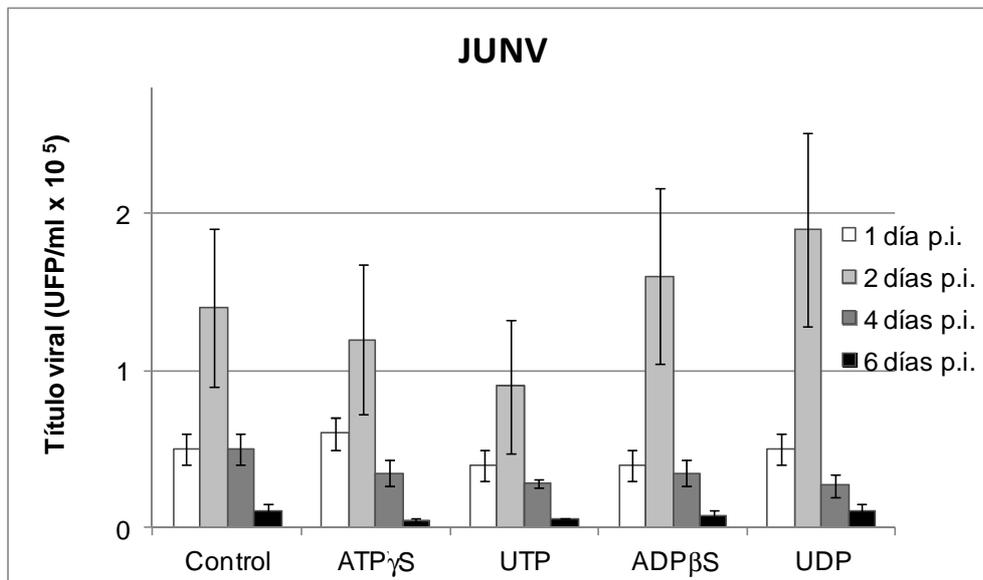


Figura 45. Crecimiento de JUNV en los OBCs infectados y tratados con agonistas purinérgicos. Los OBCs se infectaron con JUNV a una m.o.i. de 10^{-1} UFP/célula el mismo día de comienzo del tratamiento con ATP γ S, UTP, ADP β S o UDP 10 μ M. Los desvíos corresponden a dos experimentos realizados por duplicado. * $p < 0,05$ vs control sin infectar. $p > 0,05$ control de cada día en todos los casos.

Estos ensayos se complementaron estudiando la expresión de N por WB. Como puede observarse en la Fig. 46, todos los cultivos presentaron una banda de 65 kDa correspondiente a N. Sin embargo, a diferencia del cultivo control (-) infectado (+JUNV) que sólo mostró esa banda, los cultivos tratados con los distintos nucleótidos exhibieron otras dos bandas (de 43-45 y 25 kDa) correspondientes a péptidos truncados derivados de N que suelen observarse comúnmente a medida que transcurre el tiempo p.i. y son muy comunes durante la etapa persistente de JUNV en células Vero (Ellenberg y col., 2002).

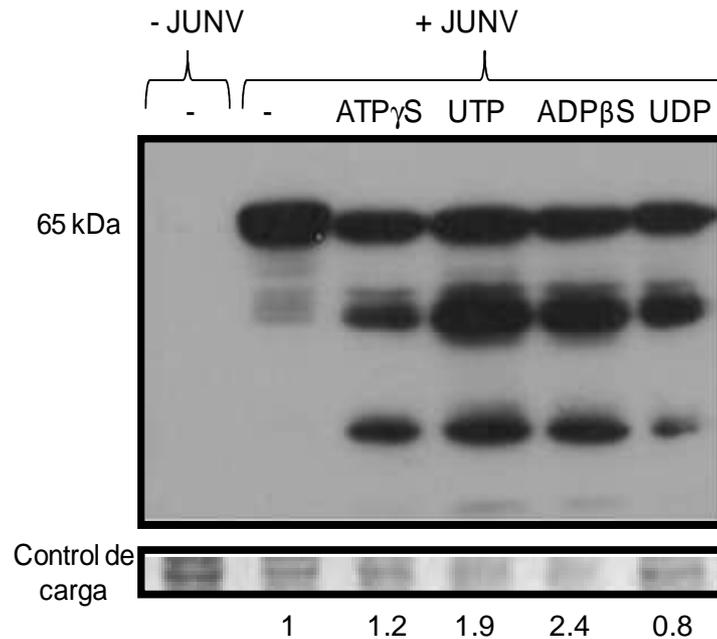


Figura 46. Expresión de la proteína N en los OBCs tratados con agonistas purinérgicos. Los OBCs fueron infectados (+JUNV) al inicio de los tratamientos (vehículo, ATP γ S, UTP, ADP β S o UDP 10 μ M) o se mantuvieron sin infectar (- JUNV). Los estudios por WB de la proteína N se realizaron a los 7 días p.i., junto con el control de carga. Al pie de cada calle se muestra el valor de la intensidad de cada banda de 65 kDa normalizada respecto de la intensidad de la banda del control de carga y relativizado al control (-) infectado con JUNV (+JUNV). Esta figura es representativa de dos experimentos independientes realizados por separado.

XII-5- Estudio de la BMP-4, BMP-6, BSP, y FAL en los OBCs infectados con JUNV

Por otro lado se repitió el estudio de los genes que presentaron los cambios más importantes frente a la infección con MEV (BMP-4, 6, BSP y FAL). Para ello los OBCs infectados con JUNV fueron analizados por QRT-PCR al día 2 p.i. (Fig. 47). En esta figura, se observa que sólo BMP-6 presentó cambios significativos respecto a los controles, mientras que no se observaron cambios en la expresión génica de BMP-4, BSP y FAL, respecto a los controles.

Los datos obtenidos en la Fig. 47 sugieren que el incremento de la expresión de BMP-6, observado tanto para MEV (ver Fig. 31.) como para JUNV, podría estar asociado a un patrón de respuesta común a infecciones

virales en los osteoblastos. Por otro lado, al comparar la intensidad de la respuesta a la infección, el estímulo ejercido por JUNV sobre la expresión génica de BMP-6 resultó menor al generado por MEV (ver Fig. 31F y 47B).

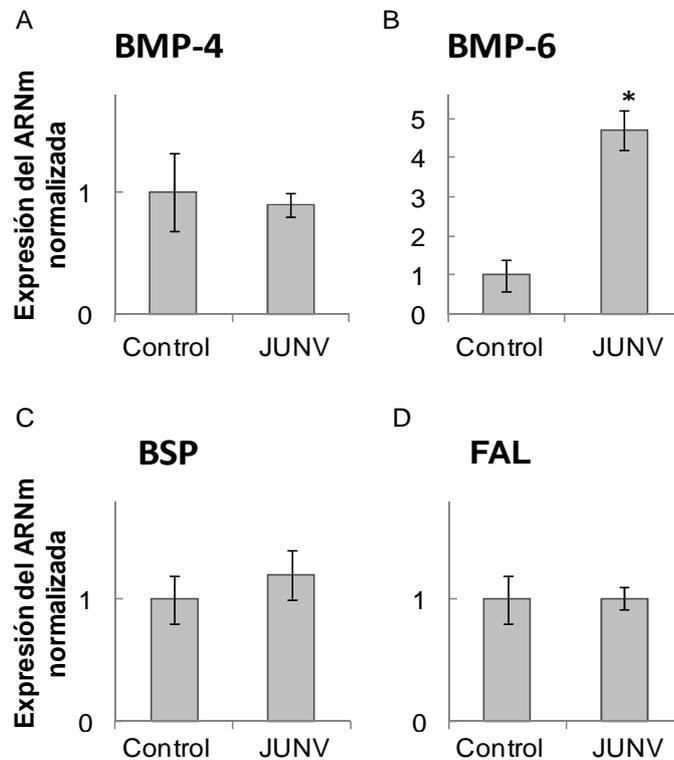


Figura 47. Expresión de BMP-4, 6, BSP y FAL en los OBCs infectados con JUNV.

Los OBCs cultivados en medio osteogénico fueron infectados con JUNV al inicio del tratamiento (JUNV) o se dejaron sin infectar (Control). Los cultivos se incubaron por 2 días y posteriormente estas muestras fueron procesadas como se indica en la Metodología para proceder a la cuantificación del ADNc correspondiente a los genes indicados en la figura por QRT-PCR. Los resultados se encuentran expresados en unidades arbitrarias y los niveles de expresión de los genes blanco fueron normalizados respecto al control sin infectar del día 2 para cada gen. BMP-4/6: proteína morfogénica ósea-4/6, BSP: sialo-proteína ósea, FAL: fosfatasa alcalina. Los resultados se presentan como el promedio \pm DE de los datos tomados de dos experimentos individuales realizados por triplicado. * $p < 0,05$ vs control.

Se sabe que BMP-6 es un factor importante, para la correcta resolución de enfermedades infecciosas tales como malaria, tuberculosis y el virus de la VIH

tipo 1 (Armitage y col., 2011; Kautz y col., 2008), y en esta Tesis se manifiesta que tanto la infección de los osteoblastos con MEV o JUNV incrementa los niveles de BMP-6. Asimismo, el sistema de OBCs infectados con JUNV avanzó hacia la persistencia viral por lo que este modelo sería una alternativa interesante para el abordaje del estudio de la otosclerosis.

Reportes previos han descripto la multiplicación de distintos virus en osteoblastos. Tal es el caso del virus de la encefalitis equina oriental (VEEO), perteneciente al género alfavirus que es patógeno para equinos y el hombre (de la Monte y col., 1985; Johnson y Martin, 1974; Zhang y col., 2007). Este virus además de infectar células dendríticas, también infecta a cultivos primarios de osteoblastos de calvaria murina donde replica completamente su genoma (Gardner y col., 2008). Por otro lado, Vogel y col., (2005) demostraron *in vivo* que VEEO utilizaba a los osteoblastos, como principal sustrato de multiplicación para su amplificación a nivel periférico. Dado los resultados de esta Tesis, los estudios de Vogel, nos hacen suponer que, MEV también podría utilizar a los osteoblastos para replicarse en gran medida, dado que al comparar los títulos obtenidos al infectar con JUNV se puede ver que éstos últimos son muy inferiores a los producidos por MEV en OBCs.

Por otro lado, se ha comprobado que el VIH, en particular la glicoproteína gp120, incrementa la apoptosis en cultivos primarios de osteoblastos (Gibelini y col., 2008), reduce la deposición de calcio, la actividad FAL, la expresión de Runx-2 (Cotter y col., 2007) y afecta la diferenciación de dichas células (Cotter y col., 2007 y 2009). Estas interacciones podrían ser la causa de las observaciones realizadas en pacientes con VIH y su propensión a sufrir fracturas (Triant y col., 2008, Young y col., 2011; Womack y col., 2011), debido a osteopenia, osteoporosis y/o osteonecrosis (Brown y Qaquish, 2006; Miller y col., 2005; Gutiérrez y col., 2002; Morse y col., 2007; Gutiérrez y col., 2006), probablemente dado a que la infección con VIH estimula el incremento de TNF- α , el cual induce la apoptosis de los osteoblastos por mecanismos autocrinos y paracrinos (Gibelini y col., 2008; Hittinger y col., 1998).

Otro ejemplo descripto en bibliografía de virus que pueden infectar osteoblastos es el del virus de la Hepatitis C (VHC) que puede infectar el hueso, replicando en células osteoprogenitoras y osteoblastos humanos

(Kluger y col., 2005). Los pacientes infectados con VHC pueden presentar cuadros de osteosclerosis (aumento de la densidad ósea, no confundir con otosclerosis), enfermedad de la que hasta el momento se conoce muy poco. En estos pacientes el nivel sérico de FAL se encuentra aumentado, y los de calcio disminuido (Tanaka y col., 2006), y poseen un gran número de osteoblastos positivos para OPG (Manganelli y col., 2005). Además, los cultivos de líneas celulares osteoblásticas, MC3T3-E1, incubados con suero de estos pacientes incrementaron la expresión de TGF- β y la proteína Smad-3 (Sowa y col., 2003). Sabiendo que un incremento en la actividad de FAL es indicio de diferenciación de los osteoblastos, y que las BMPs activan la vía Smad que desemboca en la activación de Runx-2, el cual es importante para que la diferenciación de osteoblastos suceda, estos reportes refuerzan la conexión entre la infección viral y la activación de la vía de las BMPs/Smad.

En este marco, las investigaciones presentadas en este trabajo proveen una nueva perspectiva para entender el complejo mecanismo de multiplicación viral de MEV y JUNV en los OBCs y así encarar el desarrollo racional de agentes antivirales dirigidos a este blanco de acción para la prevención y tratamiento de la otosclerosis y también se podría considerar para Paget, enfermedades de gran impacto e implicancia global.

Conclusiones

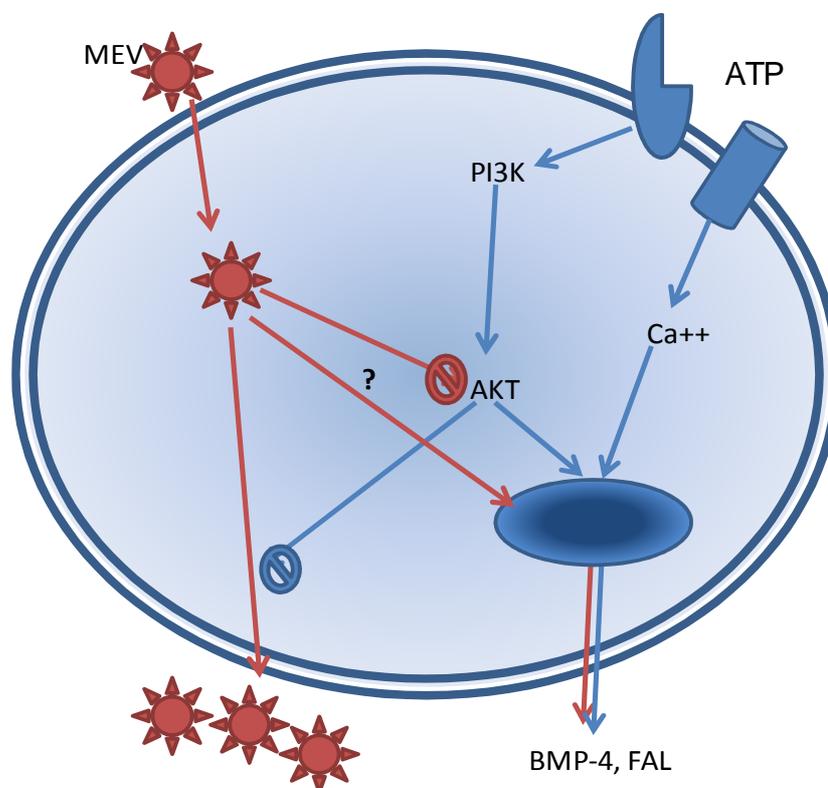
Los resultados obtenidos en esta Tesis permiten concluir que:

En los osteoblastos de calvaria de rata:

- La estimulación por ATP de receptores P2Y₂ favorece el progreso de la fase G₀ a S del ciclo e incrementa la proliferación celular y la diferenciación a osteoblastos maduros, esto último evidenciado por los incrementos detectados en la actividad y expresión de FAL, la mineralización de los cultivos y por la inducción de cambios morfológicos tempranos típicos de osteoblastos maduros. Estos receptores también serían los principales candidatos responsables de la estimulación por ATP de la expresión génica de OPG, Col1 α 1/2, FAL, BSP, BMP-2, 4, 5 y 7, proteínas asociadas a actividad osteoblástica.
- los receptores P2Y₄ favorecen la expresión de BMP-3.
- los receptores P2Y_{1, 12, 13} estimulan la expresión de BMP-3 y 6.
- los receptores P2Y₆ ejercen un efecto positivo sobre la expresión de BMP-1 y 6, y a tiempos largos sobre BMP-2 y 3.
- Exceptuando a P2Y₄, los demás receptores P2 disminuyen la producción de OPG, usando agonistas a concentraciones de 100 μ M.
- la vía PI3K/AKT se encontraría involucrada en los efectos ejercidos por el ATP sobre la proliferación y diferenciación celular, mostrando además, participar en la regulación de la expresión génica de FAL y BMP-4.

En los osteoblastos de calvaria de rata infectados con MEV:

- este sistema representa un modelo biológico de estudio *in vitro* de la otosclerosis, por primera vez reportado en la literatura
- los niveles génicos de BMP-1, 4, 5, 6 y 7, BSP, Col1 α 1/2, OPG y FAL se vieron incrementados luego de la infección en etapas tempranas de la diferenciación de los osteoblastos. Siendo más importantes los incrementos para BMP-4, 5, 6, BSP y FAL
- la activación de los receptores P2Y₁, ₁₂, ₁₃ inhibe la multiplicación o liberación viral
- la estimulación de la expresión génica de BMP-4 y FAL ocurriría por una vía alterna a PI3K/AKT
- MEV tendría la capacidad de bloquear la vía PI3K/AKT como así también de utilizar productos intermedios de dicha vía
- el bloqueo de la vía PI3K/AKT no inhibe la replicación viral.



En los osteoblastos de calvaria de rata infectados con JUNV:

- este sistema representa un potencial candidato como modelo de estudio *in vitro* de infecciones persistentes en osteoblastos
- los tratamientos con los nucleótidos no modificaron de manera significativa el título viral de los cultivos infectados respecto a los controles. Sin embargo, los cultivos tratados, además de la banda de 65 kDa correspondiente a N, mostraron aumentadas otras dos bandas (de 43-45 y 25 kDa) correspondientes a péptidos truncados derivados de esta proteína que suelen observarse comúnmente a medida que transcurre el tiempo p.i. y son muy comunes durante la etapa persistente de JUNV en células Vero
- BMP-6 presentó cambios significativos en su expresión génica respecto a los controles sin infectar

Publicaciones
durante la formación doctoral

- **VB. Ayala-Peña**, LA. Scolaro, GE. Santillán. ATP and UTP stimulate bone morphogenetic protein-2, -4 and -5 gene expression and mineralization by rat primary osteoblasts involving PI3K/AKT pathway. (2013) *Experimental Cell Research*. 319:2028-36. ISSN: 0014-4827
- **VB. Ayala-Peña**, GE. Santillán, LA. Scolaro. Measles virus can infect rat primary osteoblasts cells. Trabajo en proceso de redacción.
- **Ayala P. VB.**, Santillán GE. Efecto del ATP en el ciclo celular y diferenciación de osteoblastos. (2012) Ebaldi-Editorial Académica Española. ISBN: 9783659054433
- Katz S., **Ayala V.**, Santillán G., Boland R. Activation of the PI3K/Akt signaling pathway through P2Y₂ receptors stimulation by extracellular ATP is involved in osteoblastic cell proliferation. (2011) *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 513:144-52. ISSN: 0003 9861.
- **VB. Ayala Peña**, IC. Bonini, S Antollini, T Kobayashi, FJ. Barrantes. $\alpha 7$ -type acetylcholine receptor localization and its modulation by nicotine and cholesterol in vascular endothelial cells. (2011) *Journal of Cellular Biochemistry*. 112:3276-88. ISSN: 1097 4644.
- Barrantes FJ, Bermudez V, Borroni MV, Antollini SS, Pediconi MF, Baier JC, Bonini I, Gallegos C, Roccamo AM, Valles AS, **Ayala V**, Kamerbeek C. Boundary Lipids In The Nicotinic Acetylcholine Receptor Microenvironment. (2010) *Journal of Molecular Neuroscience*. 40:87. ISSN: 0895 8696.

Bibliografía

- ❖ Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems J-M, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Knight GE, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA. Internacional Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev.* 2006; 58: 281-341.
- ❖ Abend JR, Imperiale MJ. Transforming growth factor-beta-mediated regulation of BK virus gene expression. *Virology.* 2008;378:6-12.
- ❖ Alvarenga EC, Rodrigues R, Caricati-Neto A, Silva-Filho FC, Paredes-Gamero EJ, Ferreira AT. Low-intensity pulsed ultrasound-dependent osteoblast proliferation occurs by via activation of the P2Y receptor: role of the P2Y1 receptor. *Bone.* 2010; 46:355-62.
- ❖ Ambrosio AM, Enria DA, Maiztegui JI. Junin virus isolation from lymphomononuclear cells of patients with Argentine hemorrhagic fever. *Intervirology.* 1986;25:97-102.
- ❖ Armitage A, Eddowes L, Gileadi U, Cole S, Spottiswoode N, Selvakumar T, Ho L, Townsend L, Drakesmith H. Hepcidin regulation by innate immune and infectious stimuli. *Blood.* 2011;118:4129-39.
- ❖ Arnold W, Altermatt HJ, Kraft R, Pfaltz CR. Otosclerosis. A paramyxovirus-induced inflammatory reaction. *HNO.* 1989;37:236-41.
- ❖ Arnold W, Friedmann I. Detection of measles and rubella-specific antigens in the endochondral ossification zone in otosclerosis. *Laryngol Rhinol Otol (Stuttg).* 1987;66:167-71.
- ❖ Aubin JE. Regulation of osteoblast formation and function. *Rev Endocr Metab Disord.* 2001;2:81-94
- ❖ Auperin DD, Galinski M, Bishop DH. The sequences of the N protein gene and intergenic region of the S RNA of pichinde arenavirus. *Virology.* 1984;134:208-19.
- ❖ Avota E, Avots A, Niewiesk S, Kane LP, Bommhardt U, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S. Disruption of Akt kinase activation is important for immunosuppression induced by measles virus. *Nat Med.* 2001;7:725-31.
- ❖ Avota E, Muller N, Klett M, Schneider-Schaulies S. Measles virus interacts with and alters signal transduction in T-cell lipid rafts. *J Virol* 2004; 78:9552–59.

- ❖ Bandyopadhyay A, Tsuji K, Cox K, Harfe BD, Rosen V, Tabin CJ. Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. *PLoS Genet.* 2006; 2:e216.
- ❖ Barhanpurkar AP, Gupta N, Srivastava RK, Tomar GB, Naik SP, Joshi SR, Pote ST, Mishra GC, Wani MR. IL-3 promotes osteoblast differentiation and bone formation in human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;418:669-75.
- ❖ Barnard DL. Inhibitors of measles virus. *Antivir Chem Chemother* 2004;15:111-9.
- ❖ Basle MF, Fournier JG, Rozenblatt S, Rebel A, Bouteille M. Measles virus ARN detected in Paget's disease bone tissue by in situ hybridization. *J Gen Virol.* 1986;67: 907-13.
- ❖ Beckham CJ, Parker R. P bodies, stress granules, and viral life cycles. *Cell Host Microbe.* 2008;3:206-12.
- ❖ Beckham JD, Tuttle K, Tyler KL. Reovirus activates transforming growth factor beta and bone morphogenetic protein signaling pathways in the central nervous system that contribute to neuronal survival following infection. *J Virol.* 2009;83:5035-45.
- ❖ Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Robey PG. Expression of bone sialoprotein BSP in developing human tissues. *Calcif Tissue Int* 1991;49:421-6.
- ❖ Boskey A, Gadaleta S, Gundberg C, Doty SB, Ducy P, Karsenty G. Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin. *Bone.* 1998; 23:187–196.
- ❖ Bostrom MP, Lane JM, Berberian WS, Missri AA, Tomin E, Weiland A, Doty SB, Glaser D, Rosen VM. Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. *J Orthop Res.* 1995;13:357-67.
- ❖ Bowler WB, Birch MA, Gallagher JA, Bilbe G. Identification and cloning of human P2U purinoceptor present in osteoclastoma, bone, and osteoblasts. *J Bone Miner Res.* 1995;10:1137-45.

- ❖ Bowler WB, Buckley KA, Gartland A, Hipskind RA, Bilbe G, Gallagher JA. Extracellular nucleotide signaling: a mechanism for integrating local and systemic responses in the activation of bone remodeling. *Bone*. 2001;28:507-12.
- ❖ Bowler WB, Dixon CJ, Halleux C, Maier R, Bilbe G, Fraser W, Gallagher J, Hipskind R. Signaling in human osteoblasts by extracellular nucleotides. Their weak induction of the c-fos proto-oncogene via Ca²⁺ mobilization is strongly potentiated by a parathyroid hormone/cAMP-dependent protein kinase pathway independently of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 1999; 274:14315-24.
- ❖ Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther*. 2007; 9: 1186-2165.
- ❖ Bretlau P, Causse J, Jorgensen MB, Chevance LG. Histiocytic activity in the otosclerotic bone. *Arch Klin Exp Ohren Nasen Kehlkopfheilkd*. 1971;198:301-16.
- ❖ Bretscher A, Edwards K, Fehon RG. ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:586–599
- ❖ Brown TT, Qaqish RB. Antiretroviral therapy and the prevalence of osteopenia and osteoporosis: a meta-analytic review. *AIDS*. 2006;20:2165-74.
- ❖ Brownstein Z, Goldfarb A, Levi H, Frydman M, Avraham KB. Chromosomal mapping and phenotypic characterization of hereditary otosclerosis linked to the OTSC4 locus. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006;132:416-24.
- ❖ Buchmeier MJ. Arenaviruses: protein structure and function. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2002;262:159-73.
- ❖ Buckley KA, Golding SL, Rice JM, Dillon JP, Gallagher JA. Release and interconversion of P2 receptor agonists by human osteoblast-like cells. *Faseb J*. 2003; 17:1401-10.
- ❖ Burnstock G. Purinergic signalling. *Br J Pharmacol*. 2006; 147 Suppl 1:S172-81.
- ❖ Calabrese F, Kipar A, Lunardi F, Balestro E, Perissinotto E, Rossi E, Nannini N, Marulli G, Stewart JP, Rea F. Herpes virus infection is

associated with vascular remodeling and pulmonary hypertension in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One*. 2013;8:e55715.

- ❖ Calpe S, Wang N, Romero X, Berger SB, Lanyi A, Engel P, Terhorst C. The SLAM and SAP gene families control innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol*. 2008;97:177-250.
- ❖ Carsillo M, Kim D, Niewiesk S, Soltanoff CS, Yang S, Chen W, Li YP. Role of AKT kinase in measles virus replication. Signaling networks that control the lineage commitment and differentiation of bone cells. *J Virol*. 2010;84:2180-3.
- ❖ Chhatriwala M, Ravi RG, Patel RI, Boyer JL, Jacobson KA, Harden TK. Induction of novel agonist selectivity for the ADP-activated P2Y1 receptor versus the ADP-activated P2Y12 and P2Y13 receptors by conformational constraint of an ADP analog. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;311:1038-43.
- ❖ Chole RA, McKenna M. Pathophysiology of otosclerosis. *Otol Neurotol*. 2001;22:249-57.
- ❖ Cooper LF, Yliheikkilä PK, Felton DA, Whitson SW. Spatiotemporal assessment of fetal bovine osteoblast culture differentiation indicates a role for BSP in promoting differentiation. *J Bone Miner Res* 1998;13:620-32.
- ❖ Costessi A, Pines A, D'Andrea P, Romanello M, Damante G, Cesaratto L, Quadrifoglio F, Moro L, Tell G. Extracellular nucleotides activate Runx2 in the osteoblast-like HOBIT cell line: a possible molecular link between mechanical stress and osteoblasts' response. *Bone*. 2005;36:418-32.
- ❖ Cotter EJ, Ip HS, Powderly WG, Doran PP. Mechanism of HIV protein induced modulation of mesenchymal stem cell osteogenic differentiation. *BMC Musculoskelet Disord*. 2008. 13;9:33.
- ❖ Cotter EJ, Malizia AP, Chew N, Powderly WG, Doran PP. HIV proteins regulate bone marker secretion and transcription factor activity in cultured human osteoblasts with consequent potential implications for osteoblast function and development. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2007;23:1521-30.
- ❖ Cotter EJ, Mallon PW, Doran PP. Is PPAR γ a prospective player in HIV-1-associated bone disease? *PPAR Res*. 2009;9:421376.
- ❖ Crotty S, Cameron CE, Andino R. RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:6895-900.

- ❖ Crotty S, Maag D, Arnold JJ, Zhong W, Lau JY, Hong Z, Andino R, Cameron CE. The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nat Med.* 2000;6:1375-9.
- ❖ Csiszar A, Lehoux S, Ungvari Z. Hemodynamic forces, vascular oxidative stress, and regulation of BMP-2/4 expression. *Antioxid Redox Signal.* 2009; 11:1683-97.
- ❖ Csomor P, Liktör B, Liktör B, Szekanecz Z, Sziklai I, Karosi T. Expression of bone morphogenetic protein 2, 4, 5, and 7 correlates with histological activity of otosclerotic foci. *Acta Otolaryngol.* 2012;132:624-31.
- ❖ Csomor P, Sziklai I, Liktör B, Szabó L, Pytel J, Jóri J, Karosi T. Otosclerosis: disturbed balance between cell survival and apoptosis. *Otol Neurotol.* 2010;31:867-74.
- ❖ de Gorter DJ, van Dinther M, Korchynskiy O, ten Dijke P. Biphasic effects of transforming growth factor β on bone morphogenetic protein-induced osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res.* 2011;26:1178-87.
- ❖ de la Monte, S., F. Castro, N. J. Bonilla, A. Gaskin de Urdaneta, and G. M. Hutchins. The systemic pathology of Venezuelan equine encephalitis virus infection in humans. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1985. 34:194–202.
- ❖ Declau F, Van Spaendonck M, Timmermans JP, Michaels L, Liang J, Qiu JP, Van de Heyning P. Prevalence of otosclerosis in an unselected series of temporal bones. *Otol Neurotol.* 2001;22:596-602.
- ❖ del Toro-Riera M, Macaya-Ruiz A, Raspall-Chaure M, Tallada-Serra M, Pasqual-López I, Roig-Quilis M. Subacute sclerosing panencephalitis: combined treatment with interferon alpha and intraventricular ribavirin. *Rev Neurol.* 2006;42:277-81.
- ❖ Denhardt D, Noda M, O'Regan A, Pavlin D, Berman J Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest.* 2001;107:1055–1061.
- ❖ Deschaght P, De Baere T, Van Simaey L, Van Daele S, De Baets F, De Vos D, PiARNy JP, Vaneechoutte M. Comparison of the sensitivity of culture, PCR and quantitative real-time PCR for the detection of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum of cystic fibrosis patients. *BMC Microbiol.* 2009; 9:244.

- ❖ Dixon CJ, Bowler WB, Walsh CA, Gallagher JA. Effects of extracellular nucleotides on single cells and populations of human osteoblasts: contribution of cell heterogeneity to relative potencies. *Br J Pharmacol.* 1997; 120:777-80.
- ❖ Doms RW, Lamb RA, Rose JK, Helenius A. Folding and assembly of viral membrane proteins. *Virology.* 1993;193:545-62.
- ❖ Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A, Karsenty G. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature.* 1996; 382:448-452.
- ❖ Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997;89:747-54.
- ❖ Duke T, Mgone CS. Measles: not just another viral exanthem. *Lancet.* 2003;361:763-773.
- ❖ Dunster LM, Schneider-Schaulies J, Löffler S, Lankes W, Schwartz-Albiez. Early events in the pathogenesis of eastern equine encephalitis virus in mice. *Am. J. Pathol.* 1994;166:159-171.
- ❖ Editorial Team. Measles once again endemic in the United Kingdom. *Eurosurveillance.* 2008. 13(27) Article 3.
- ❖ Ellenberg P, Linero FN, Sclaro LA. Superinfection exclusion in BHK-21 cells persistently infected with Junín virus. *J Gen Virol.* 2007; 88:2730-9.
- ❖ Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF, Park D, Woodson RI, Ostankovich M, Sharma P, Lysiak JJ, Harden TK, Leitinger N, Ravichandran KS. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature.* 2009; 10:282-6.
- ❖ Enam S, Sweet TM, Amini S, Khalili K, Del Valle L. Evidence for involvement of transforming growth factor beta1 signaling pathway in activation of JC virus in human immunodeficiency virus 1-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Arch Pathol Lab Med.* 2004;128:282-91.
- ❖ Enria DA, Barrera Oro JG. Junin virus vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2002;263:239-61.
- ❖ Enria DA, Maiztegui JI. Antiviral treatment of Argentine hemorrhagic fever. *Antiviral Res.* 1994;23:23-31.
- ❖ Erb L, Liao Z, Seye CI, Weisman GA. P2 receptors: intracellular signaling. *Pflugers Arch.* 2006; 452:552-62.

- ❖ Evans BA, Elford C, Pexa A, Francis K, Hughes AC, Deussen A, Ham J. Human osteoblast precursors produce extracellular adenosine, which modulates their secretion of IL-6 and osteoprotegerin. *J Bone Miner Res.* 2006;21:228-36.
- ❖ Feng J, Shi Z, Ye Z. Effects of metabolites of the lignans enterolactone and enterodiol on osteoblastic differentiation of MG-63 cells. *Biol Pharm Bull.* 2008; 31:1067-70.
- ❖ Friedmann I, Arnold W. Clinical otosclerosis. *J Laryngol Otol.* 1990;104:745.
- ❖ Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC. Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:481-507.
- ❖ Fujita T, Azuma Y, Fukuyama R, Hattori Y, Yoshida C, Koida M, Ogita K, Komori T. Runx2 induces osteoblast and chondrocyte differentiation and enhances their migration by coupling with PI3K-Akt signaling. *J Cell Biol.* 2004;166:85-95.
- ❖ Fukuda M, Ikuta K, Yanagihara K, Tajima M, Kuratsune H, Kurata T, Sairenji T. Effect of transforming growth factor-beta1 on the cell growth and Epstein-Barr virus reactivation in EBV-infected epithelial cell lines. *Virology.* 2001;288:109-18.
- ❖ Gallagher JA, Buckley KA. Expression and function of P2 receptors in bone. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2002;2:432-9.
- ❖ Ganss B, Kim RH, Sodek J. Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999;10:79-98.
- ❖ Gardner CL, Burke CW, Tesfay MZ, Glass PJ, Klimstra WB, Ryman KD. Eastern and Venezuelan equine encephalitis viruses differ in their ability to infect dendritic cells and macrophages: impact of altered cell tropism on pathogenesis. *J Virol.* 2008;82:10634-46.
- ❖ Garrigue-Antar L, Barker C, Kadler KE. Identification of amino acid residues in bone morphogenetic protein-1 important for procollagen C-proteinase activity, *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 26237-42.
- ❖ Gartland A, Buckley KA, Hipskind RA, Bowler WB, Gallagher JA. P2 receptors in bone-modulation of osteoclast formation and activity via P2X7 activation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2003;13:237-42.

- ❖ Gautschi OP, Cadosch D, Zellweger R, Joesbury KA, Filgueira L. Apoptosis induction and reduced proliferation in human osteoblasts by rhBMP-2, -4 and -7. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2009; 9:53-60.
- ❖ Gehron-Robey, P. Bone matrix proteoglycans and glycoproteins. *Principles of bone biology.* 1996; pp.155–165.
- ❖ Genetos DC, Geist DJ, Liu D, Donahue HJ, Duncan RL. Fluid shear-induced ATP secretion mediates prostaglandin release in MC3T3-E1 osteoblasts. *J Bone Miner Res.* 2005; 20:41-9.
- ❖ Ghorayeb BY, Linthicum FH Jr. Otosclerotic inner ear syndrome. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1978;87:85-90.
- ❖ Ghosh-Choudhury N, Abboud SL, Nishimura R, Celeste A, Mahimainathan L, Choudhury GG. Requirement of BMP-2-induced phosphatidylinositol 3-kinase and Akt serine/threonine kinase in osteoblast differentiation and Smad-dependent BMP-2 gene transcription. *J Biol Chem.* 2002;277:33361-8.
- ❖ Giachelli CM, Steitz S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biol.* 2000;19:615-22.
- ❖ Gibellini D, De Crignis E, Ponti C, Cimatti L, Borderi M, Tschon M, Giardino R, Re MC. HIV-1 triggers apoptosis in primary osteoblasts and HOBIT cells through TNF α activation. *J Med Virol.* 2008;80:1507-14.
- ❖ Gómez RM, Jaquenod de Giusti C, Sanchez Vallduvi MM, Frik J, Ferrer MF, Schattner M. Junín virus. A XXI century update. *Microbes Infect.* 2011;13:303-11.
- ❖ Gordon JA, Tye CE, Sampaio AV, Underhill TM, Hunter GK, Goldberg HA. Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. *Bone.* 2007;41:462-73.
- ❖ Goswami BB, Borek E, Sharma OK, Fujitaki J, Smith RA. The broad spectrum antiviral agent ribavirin inhibits capping of mRNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 1979;89:830-6.
- ❖ Gridley DS, Sura SS, Uhm JR, Lin CH, Kettering JD. Effects of anti-transforming growth factor-beta antibody and interleukin-2 in tumor-bearing mice. *Cancer Biother.* 1993;8:159-70.

- ❖ Gu K, Zhang L, Jin T, Rutherford RB. Identification of potential modifiers of Runx2/Cbfa1 activity in C2C12 cells in response to bone morphogenetic protein-7. *Cells Tissues Organs*. 2004; 176:28-40.
- ❖ Guntur AR, Rosen CJ, Naski MC., N-cadherin adherens junctions mediate osteogenesis through PI3K signaling. *Bone*. 2012;50:54-62.
- ❖ Guntur AR, Rosen CJ. The skeleton: a multi-functional complex organ: new insights into osteoblasts and their role in bone formation: the central role of PI3Kinase. *J Endocrinol*. 2011;211:123-30.
- ❖ Guo X, Wang XF. Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. *Cell Res*. 2009; 19:71-88.
- ❖ Gutiérrez F, Padilla S, Masiá M, Flores J, Boix V, Merino E, Galindo J, Ortega E, López-Aldeguer J, Galera C; HIV-related Osteonecrosis Study Group. Osteonecrosis in patients infected with HIV: clinical epidemiology and natural history in a large case series from Spain. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2006;42:286-92.
- ❖ Gutiérrez Rodero F, Padilla Urrea S. Bone metabolism disorders and avascular bone necrosis: a further problem in HIV-infected patients?. *Med Clin (Barc)*. 2002;119:103-8.
- ❖ Hamza MA, Higgins DM, Ruyechan WT. Herpes simplex virus type-1 latency-associated transcript-induced immunoreactivity of substance P in trigeminal neurons is reversed by bone morphogenetic protein-7. *Neurosci Lett*. 200;413:31-5.
- ❖ Harden TK, Lazarowski ER. Release ATP and UTP from astrocytoma cells. *Prog Brain Res*. 1999; 120:135-43.
- ❖ Harris H. The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. *Clin Chim Acta* .1989; 186:133-150.
- ❖ Hashiguchi T, Kajikawa M, Maita N, Takeda M, Kuroki K, Sasaki K, Kohda D, Yanagi Y, Maenaka K. Crystal structure of measles virus hemagglutinin provides insight into effective vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:19535-40.
- ❖ Hayton MJ, Dillon JP, Glynn D, Curran JM, Gallagher JA, Buckley KA. Involvement of adenosine 5'-triphosphate in ultrasound-induced fracture repair. *Ultrasound Med Biol*. 2005;31:1131-8.

- ❖ Helder MN, Ozkaynak E, Sampath KT, Luyten FP, Latin V, Oppermann H, Vukicevic S. Expression pattern of osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in human and mouse development. *J Histochem Cytochem.* 1995;43:1035-44.
- ❖ Helenius A. How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 1994;5:253–265.
- ❖ Hiles ID, Otsu M, Volinia S, Fry MJ, Gout I, Dhand R, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase: structure and expression of the 110 kd catalytic subunit. *Cell.* 1992;70:419-29.
- ❖ Hilleman MR. Current overview of the pathogenesis and prophylaxis of measles with focus on practical implications. *Vaccine.* 2002;20:651-65.
- ❖ Hirano A. Subacute sclerosing panencephalitis virus dominantly interferes with replication of wild-type measles virus in a mixed infection: implication for viral persistence. *J Virol.* 1992;66:1891-8.
- ❖ Hittinger G, Poggi C, Delbeke E, Profizi N, Lafeuillade A. Correlation between plasma levels of cytokines and HIV-1 RNA copy number in HIV-infected patients. *Infection.* 1998;26:100-3.
- ❖ Hoebertz A, Arnett TR, Burnstock G. Regulation of bone resorption and formation by purines and pyrimidines. *Trends Pharmacol Sci.* 2003; 24:290-7.
- ❖ Hoebertz A, Mahendran S, Burnstock G, Arnett TR. ATP and UTP at low concentrations strongly inhibit bone formation by osteoblasts: a novel role for the P2Y2 receptor in bone remodeling. *J Cell Biochem.* 2002; 86:413-9.
- ❖ Hoebertz A, Townsend-Nicholson A, Glass R, Burnstock G, Arnett TR. Expression of P2 receptors in bone and cultured bone cells. *Bone.* 2000; 27:503-10.
- ❖ Hoemann CD, El-Gabalawy H, McKee MD. In vitro osteogenesis assays: influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathol Biol Paris.* 2009; 57:318-23.
- ❖ Hopkins DR, Keles S, Greenspan DS. The bone morphogenetic protein 1/Tolloid-like metalloproteinases, *Matrix Biol.* 2007; 26: 508–523.
- ❖ Horvath RJ, DeLeo JA. Morphine enhances microglial migration through modulation of P2X4 receptor signaling. *J Neurosci.* 2009;29:998-1005.

- ❖ Hosoya M. Therapy and prognosis in subacute sclerosing panencephalitis. *Nihon Rinsho*. 2007;65:1483-6.
- ❖ Howard CR, Lewicki H, Allison L, Salter M, Buchmeier MJ. Properties and characterization of monoclonal antibodies to Tacaribe virus. *J Gen Virol*. 1985;66:1383-95.
- ❖ Huang Z, Nelson ER, Smith RL, Goodman SB. The sequential expression profiles of growth factors from osteoprogenitors to osteoblasts in vitro. *Tissue Eng*. 2007; 13:2311-20.
- ❖ Huang Z, Ren PG, Ma T, Smith RL, Goodman SB. Modulating osteogenesis of mesenchymal stem cells by modifying growth factor availability. *Cytokine*. 2010; 51:305-10.
- ❖ Hunter GK, Goldberg HA. Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:8562-5.
- ❖ Ignatius A, Schoengraf P, Kreja L, Liedert A, Recknagel S, Kandert S, Brenner RE, Schneider M, Lambris JD, Huber-Lang M. Complement C3a and C5a modulate osteoclast formation and inflammatory response of osteoblasts in synergism with IL-1 β . *J Cell Biochem*. 2011;112:2594-605.
- ❖ Ikegame M, Ishibashi O, Yoshizawa T, Shimomura J, Komori T, Ozawa H, Kawashima H. Tensile stress induces bone morphogenetic protein 4 in preosteoblastic and fibroblastic cells, which later differentiate into osteoblasts leading to osteogenesis in the mouse calvariae in organ culture. *J Bone Miner Res*. 2001; 16:24-32.
- ❖ Ishida M, Amano S. Osteocalcin fragment in bone matrix enhances osteoclast maturation at a late stage of osteoclast differentiation. *J Bone Miner Metab*. 2004; 22:415-29.
- ❖ Itoh K, Sakakibara M, Yamasaki S, Takeuchi A, Arase H, Miyazaki M, Nakajima N, Okada M, Saito T. Cutting edge: negative regulation of immune synapse formation by anchoring lipid raft to cytoskeleton through Cbp-EBP50-ERM assembly. *J Immunol* 2002;168: 541–544.
- ❖ Jacques-Silva MC, Rodnight R, Lenz G, Liao Z, Kong Q, Tran M, Kang Y, Gonzalez FA, Weisman GA, Neary JT. P2X7 receptors stimulate AKT phosphorylation in astrocytes. *Br J Pharmacol*. 2004; 141:1106-17.

- ❖ Jang WG, Kim EJ, Kim DK, Ryoo HM, Lee KB, Kim SH, Choi HS, Koh JT. BMP2 protein regulates osteocalcin expression via Runx2-mediated Atf6 gene transcription. *J Biol Chem.* 2012;287:905-15
- ❖ Jasuja R, Ge G, Voss NG, Lyman-Gingerich J, Branam AM, Pelegri FJ, Greenspan DS. Bone morphogenetic protein 1 prodomain specifically binds and regulates signaling by bone morphogenetic proteins 2 and 4. *J Biol Chem.* 2007; 282:9053-62.
- ❖ Jiménez C, Jones DR, Rodríguez-Viciana P, González-García A, Leonardo E, Wennstrom S, et al. Identification and characterization of a new oncogene derived from the regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Embo J.* 1998;17:743-53.
- ❖ Johnson, K. M., y D. H. Martin. Venezuelan equine encephalitis. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 1974;18:79–116.
- ❖ Jorgensen NR, Geist ST, Civitelli R, Steinberg TH. ATP- and gap junction-dependent intercellular calcium signaling in osteoblastic cells. *J Cell Biol.* 1997; 139:497-506.
- ❖ Karosi T, Jókay I, Kónya J, Petkó M, Szabó LZ, Sziklai I. Expression of measles virus receptors in otosclerotic, non-otosclerotic and in normal stapes footplates. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2007; 264:607-613.
- ❖ Karosi T, Jókay I, Kónya J, Petkó M, Szabó LZ, Pytel J, Jóri J, Sziklai I. Activated osteoclasts with CD51/61 expression in otosclerosis. *Laryngoscope.* 2006; 116:1478-1484.
- ❖ Karosi T, Sziklai I. Etiopathogenesis of otosclerosis. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2010; 267:1337-1349.
- ❖ Katz S, Ayala V, Santillán G, Boland R. Activation of the PI3K/Akt signaling pathway through P2Y2 receptors by extracellular ATP is involved in osteoblastic cell proliferation. *Arch Biochem Biophys* 2011;513:144-52.
- ❖ Katz S, Boland R, Santillán G. Modulation of ERK 1/2 and p38 MAPK signaling pathways by ATP in osteoblasts: involvement of mechanical stress-activated calcium influx, PKC and Src activation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006; 38:2082-91.
- ❖ Katz S, Boland R, Santillán G. Purinergic ATP signaling stimulates JNK1 but not JNK2 MAPK in osteoblast-like cells: contribution of intracellular

Ca²⁺ release, stress activated and L-voltage-dependent calcium influx, PKC and Src kinases. *Arch Biochem Biophys*. 2008; 477:244-52.

❖ Kautz L, Meynard D, Monnier A, Darnaud V, Bouvet R, Wang R, Deng C, Vaulont S, Mosser J, Coppin H, Roth M. Iron regulates phosphorylation of Smad1/5/8 and gene expression of Bmp6, Smad7, Id1, and Atoh in the mouse liver. *Blood*. 2008;112:1503-9.

❖ Kenyon RH, McKee KT Jr, Zack PM, Rippy MK, Vogel AP, York C, Meegan J, Crabbs C, Peters CJ. Aerosol infection of rhesus macaques with Junin virus. *Intervirology*. 1992;33:23-31.

❖ Kluger R, Mühlberger H, Hoffmann O, Berger CE, Engel A, Pavlova BG. Osteoprogenitor cells and osteoblasts are targets for hepatitis C virus. *Clin Orthop Relat Res*. 2005;433:251-7.

❖ Kreke MR, Huckle WR, Goldstein AS. Fluid flow stimulates expression of osteopontin and bone sialoprotein by bone marrow stromal cells in a temporally dependent manner. *Bone*. 2005;36:1047-55.

❖ Kumagai H, Sacktor B, Filburn CR. Purinergic regulation of cytosolic calcium and phosphoinositide metabolism in rat osteoblast-like osteosarcoma cells. *J Bone Miner Res*. 1991; 6:697-708.

❖ Lascano EF, Berria MI. Electron microscopy of the Junin virus in primary rabbit and hamster kidney cultures. *Medicina (B Aires)*. 1971;31:1-5.

❖ Lascano EF, Berria MI. Ultrastructure of Junin virus in mouse whole brain and mouse brain tissue cultures. *J Virol*. 1974;14:965-74.

❖ Lavery K, Hawley S, Swain P, Rooney R, Falb D, Alaoui-Ismaili MH. New insights into BMP-7 mediated osteoblastic differentiation of primary human mesenchymal stem cells. *Bone*. 2009; 45:27-41.

❖ Lazarowski ER, Harden TK. Quantitation of extracellular UTP using a sensitive enzymatic assay. *Br J Pharmacol*. 1999; 127:1272-8.

❖ Lazarowski ER, Sesma JI, Seminario-Vidal L, Kreda SM. Molecular mechanisms of purine and pyrimidine nucleotide release. *Adv Pharmacol*. 2011; 61:221-61.

❖ Lee KS, Hong SH, Bae SC. Both the Smad and p38 MAPK pathways play a crucial role in Runx2 expression following induction by transforming

growth factor-beta and bone morphogenetic protein. *Oncogene*. 2002; 21:7156-63.

❖ Lee SH, Lee MY, Lee JH, Han HJ. A potential mechanism for short time exposure to hypoxia-induced DNA synthesis in primary cultured chicken hepatocytes: Correlation between Ca²⁺ /PKC/MAPKs and PI3K/Akt/mTOR. *J Cell Biochem*. 2008; 104: 1598-1611.

❖ Lehnerdt G, Metz KA, Trellakis S, Jahnke K, Neumann A. Signaling by way of type IB and II bone morphogenetic protein receptors regulates bone formation in otospongiosis. *Laryngoscope*. 2007;117:812-6.

❖ Lehnerdt G, Unkel C, Metz KA, Jahnke K, Neumann A. Immunohistochemical evidence of BMP-2, -4 and -7 activity in otospongiosis. *Acta Otolaryngol*. 2008;128:13-7.

❖ Lehninger A, Nelson D, Cox M. *Principles of Biochemistry*. New York: W.H. Freeman. 2005.

❖ Leonard VH, Sinn PL, Hodge G, Miest T, Devaux P, Oezguen N, Braun W, McCray PB Jr, McChesney MB, Cattaneo R. Measles virus blind to its epithelial cell receptor remains virulent in rhesus monkeys but cannot cross the airway epithelium and is not shed. *J Clin Invest*. 2008;118:2448-58.

❖ Li X, Gao H, Uo M, Sato Y, Akasaka T, Abe S, Feng Q, Cui F, Watari F. Maturation of osteoblast-like SaoS2 induced by carbon nanotubes. *Biomed Mater*. 2009; 4:015005.

❖ Linero FN, Scolaro LA. Participation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in Junín virus replication in vitro. *Virus Res*. 2009; 145:166-70

❖ Linero FN, Thomas MG, Boccaccio GL, Scolaro LA. Junín virus infection impairs stress granule formation in Vero cells treated with arsenite via inhibition of eIF2alpha phosphorylation. 2011; *J Gen Virol*. 2011; 92: 2889-99.

❖ Liu F, Akiyama Y, Tai S, Maruyama K, Kawaguchi Y, Muramatsu K, Yamaguchi K. Changes in the expression of CD106, osteogenic genes, and transcription factors involved in the osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Metab*. 2008; 26: 312-20.

❖ Liu W, Butts S, Kim H, Frenz DA. Negative regulation of otic capsule chondrogenesis: it can make you Smad. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1116:141-8.

- ❖ Lund GA, Tyrrell DL, Bradley RD. The molecular length of measles virus RNA and the structural organization of measles nucleocapsids. *J Gen Virol* 1984;65:1535-42.
- ❖ Maier R, Glatz A, Mosbacher J, Bilbe G. Cloning of P2Y6 cDNAs and identification of a pseudogene: comparison of P2Y receptor subtype expression in bone and brain tissues. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 240:298-302.
- ❖ Maiztegui JI, McKee KT Jr, Barrera Oro JG, Harrison LH, Gibbs PH, Feuillade MR, Enria DA, Briggiler AM, Levis SC, Ambrosio AM, Halsey NA, Peters CJ. Protective efficacy of a live attenuated vaccine against Argentine hemorrhagic fever. AHF Study Group. *J Infect Dis*. 1998;177:277-83.
- ❖ Maiztegui JI. Clinical and epidemiological patterns of Argentine haemorrhagic fever. *Bull World Health Organ*. 1975;52:567-75.
- ❖ Malaval L, Modrowski D, Gupta AK, Aubin JE. Cellular expression of bone-related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures. *J Cell Physiol*. 1994; 158:555-72.
- ❖ Manganelli P, Giuliani N, Fietta P, Mancini C, Lazzaretti M, Pollini A, Quaini F, Pedrazzoni M. OPG/RANKL system imbalance in a case of hepatitis C-associated osteosclerosis: the pathogenetic key?. *Clin Rheumatol*. 2005;24:296-300.
- ❖ Markou K, Goudakos J. An overview of the etiology of otosclerosis. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2009;266:25-35.
- ❖ Martinez MG, Cordo SM, Candurra NA. Involvement of cytoskeleton in Junín virus entry. *Virus Res*. 2008;138:17-25.
- ❖ Mazerbourg S, Hsueh AJ. Genomic analyses facilitate identification of receptors and signalling pathways for growth differentiation factor 9 and related orphan bone morphogenetic protein/growth differentiation factor ligands. *Hum Reprod Update*. 2006; 12:373-83.
- ❖ McCormick RK. Osteoporosis: intergrating biomarkers and other diagnostic correlates into the management of bone fragility. *Altern Med*. 2007; 12: 113-45.

- ❖ McKenna MJ, Kristiansen AG, Bartley ML, Rogus JJ, Haines JL. Association of COL1A1 and otosclerosis: evidence for a shared genetic etiology with mild osteogenesis imperfecta. *Am J Otol.* 1998;19:604-10.
- ❖ McKenna MJ, Kristiansen AG, Haines J. Polymerase chain reaction amplification of a measles virus sequence from human temporal bone sections with active otosclerosis. *Am J Otol.* 1996;17:827-30.
- ❖ McKenna MJ, Mills BG. Immunohistochemical evidence of measles virus antigens in active otosclerosis. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1989;101:415-21.
- ❖ McKenna MJ, Mills BG. Ultrastructural and immunohistochemical evidence of measles virus in active otosclerosis. *Acta Otolaryngol Suppl.* 1990; 470:130-9.
- ❖ Mead R, Hinchliffe SJ, Morgan BP. Molecular cloning, expression and characterization of the rat analogue of human membrane cofactor protein (MCP/CD46). *Immunology.* 1999;98:137-43.
- ❖ Meeuwssen S, Persoon-Deen C, Bsibsi M, Ravid R, van Noort JM. Cytokine, chemokine and growth factor gene profiling of cultured human astrocytes after exposure to proinflammatory stimuli. *Glia.* 2003; 43:243-53.
- ❖ Meyer BJ, de la Torre JC, Southern PJ. Arenaviruses: genomic RNAs, transcription, and replication. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2002;262:139-57.
- ❖ Miller MG, Mulligan T. Human immunodeficiency virus and hypogonadal bone disease. *Pharmacotherapy.* 2005;25:632-4.
- ❖ Mills BG, Singer FR, Weiner LP, Holst PA. Immunohistological demonstration of respiratory syncytial virus antigens in Paget disease of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981; 78:1209-13.
- ❖ Miyazono K, Maeda S, Imamura T. BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005; 16:251-63.
- ❖ Moeller K, Duffy I, Duprex P, Rima B, Beschorner R, Fauser S, Meyermann R, Niewiesk S, ter Meulen V, Schneider-Schaulies J. Recombinant measles viruses expressing altered hemagglutinin (H) genes: functional separation of mutations determining H antibody escape from neurovirulence. *J Virol.* 2001;75:7612-20.

- ❖ Moeller-Ehrlich K, Ludlow M, Beschorner R, Meyermann R, Rima BK, Duprex WP, Niewiesk S, Schneider-Schaulies J. Two functionally linked amino acids in the stem 2 region of measles virus haemagglutinin determine infectivity and virulence in the rodent central nervous system. *J Gen Virol.* 2007;88:3112-20.
- ❖ Molinas FC, de Bracco MM, Maiztegui JI. Hemostasis and the complement system in Argentine hemorrhagic fever. *Rev Infect Dis.* 1989;11 Suppl 4:S762-70.
- ❖ Morey ER, Baylink JJ. Inhibition of bone formation during space flight. *Science.* 1978; 19:172-6.
- ❖ Mori T, Nakamura Y, Kato J, Yamane A, Aisa Y, Takeshita K, Okamoto S. Oral ribavirin therapy for lower respiratory tract infection of respiratory syncytial virus complicating bronchiolitis obliterans after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol.* 2011;93:132-4.
- ❖ Morse CG, Mican JM, Jones EC, Joe GO, Rick ME, Formentini E, Kovacs JA. The incidence and natural history of osteonecrosis in HIV-infected adults. *Clin Infect Dis.* 2007;44:739-48.
- ❖ Moss WJ, Ota MO, Griffin DE. Measles: immune suppression and immune responses. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36:1380-5.
- ❖ Mühlebach MD, Mateo M, Sinn PL, Prüfer S, Uhlig KM, Leonard VH, Navaratnarajah CK, Frenzke M, Wong XX, Sawatsky B, Ramachandran S, McCray PB Jr, Cichutek K, von Messling V, Lopez M, Cattaneo R. Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. *Nature.* 2011;480:530-3.
- ❖ Mukherjee A, Rotwein P. Selective signaling by Akt1 controls osteoblast differentiation and osteoblast-mediated osteoclast development. *Mol Cell Biol* 2012;32:490-500.
- ❖ Muscat M, Bang H, Wohlfahrt J y col. Measles in Europe: an epidemiological assessment. *Lancet.* 2009;373: 383-9.
- ❖ Naito M, Omoteyama K, Mikami Y, Takahashi T, Takagi M. Inhibition of Wnt/ β -catenin signaling by dexamethasone promotes adipocyte differentiation in mesenchymal progenitor cells, ROB-C26. *Histochem Cell Biol.* 2012;138:833-45.

- ❖ Nakamura E, Uezono Y, Narusawa K, Shibuya I, Oishi Y, Tanaka M, Yanagihara N, Nakamura T, Izumi F. ATP activates DNA synthesis by acting on P2X receptors in human osteoblast-like MG-63 cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000; 279:510-9.
- ❖ Nakase T, Nomura S, Yoshikawa H, Hashimoto J, Hirota S, Kitamura Y, Oikawa S, Ono K, Takaoka K. Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *J Bone Miner Res.* 1994;9:651-9.
- ❖ Niedermeyer HP, Arnold W, Schuster M, Baumann C, Kramer J, Neubert WJ, Sedlmeier R. Persistent measles virus infection and otosclerosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2001;110:897-903.
- ❖ Niedermeyer HP, Arnold W, Neubert WJ, Sedlmeier R. Persistent measles virus infection as a possible cause of otosclerosis: state of the art. *Ear Nose Throat J.* 2000;79:552-4.
- ❖ Niedermeyer HP, Gantumur T, Neubert WJ, Arnold W. Measles virus and otosclerosis. *Adv Otorhinolaryngol.* 2007;65:86-92.
- ❖ Noel D, Gazit D, Bouquet C, Apparailly F, Bony C, Poncelet P, et al. Short-term BMP-2 expression is sufficient for in vivo osteochondral differentiation of mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2004; 22:74-85.
- ❖ Norrby E, Oxman MN. Measles virus. En: Fields BN, Knipe DM, eds. *Virology.* 2ed. New York: Raven Press. 1990;1:1013-44.
- ❖ North RA, Surprenant A. Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2000; 40:563-80.
- ❖ North RA. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev.* 2002; 82:1013-67.
- ❖ Noyce RS, Bondre DG, Ha MN, Lin LT, Sisson G, Tsao MS, Richardson CD. Tumor cell marker PVRL4 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus. *PLoS Pathog.* 2011;7:e1002240.
- ❖ O'Brien CA, Jia D, Plotkin LI, Bellido T, Powers CC, Stewart SA, Manolagas SC, Weinstein RS. Glucocorticoids act directly on osteoblasts and osteocytes to induce their apoptosis and reduce bone formation and strength. *Endocrinology.* 2004;145:1835-41.

- ❖ Onishi T, Ishidou Y, Nagamine T, Yone K, Imamura T, Kato M, Sampath TK, ten Dijke P, Sakou T. Distinct and overlapping patterns of localization of bone morphogenetic protein (BMP) family members and a BMP type II receptor during fracture healing in rats. *Bone*. 1998;22:605-12.
- ❖ Ornelas IM, Ventura AL. Involvement of the PI3K/AKT pathway in ATP-induced proliferation of developing retinal cells in culture. *Int J Dev Neurosci*. 2010;28:503-11.
- ❖ Orriss IR, Knight GE, Ranasinghe S, Burnstock G, Arnett TR. Osteoblast responses to nucleotides increase during differentiation. *Bone*. 2006; 39:300-9.
- ❖ Orriss IR, Utting JC, Brandao-Burch A, Colston K, Grubb BR, Burnstock G, Arnett TR. Extracellular nucleotides block bone mineralization in vitro: evidence for dual inhibitory mechanisms involving both P2Y2 receptors and pyrophosphate. *Endocrinology*. 2007; 148:4208-16.
- ❖ Orriss IR, Wang N, Burnstock G, Arnett TR, Gartland A, Robaye B, Boeynaems JM. The P2Y(6) receptor stimulates bone resorption by osteoclasts. *Endocrinology*. 2011;152:3706-16.
- ❖ Osman L, Yacoub MH, Latif N, Amrani M, Chester AH. Role of human valve interstitial cells in valve calcification and their response to atorvastatin. *Circulation*. 2006; 114:1547-52.
- ❖ Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ. *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 1997;89:765-71.
- ❖ Panupinthu N, Rogers JT, Zhao L, Solano-Flores LP, Possmayer F, Sims SM, Dixon SJ. P2X7 receptors on osteoblasts couple to production of lysophosphatidic acid: a signaling axis promoting osteogenesis. *J Cell Biol*. 2008; 181:859-71.
- ❖ Panupinthu N, Zhao L, Possmayer F, Ke HZ, Sims SM, Dixon SJ. P2X7 nucleotide receptors mediate blebbing in osteoblasts through a pathway involving lysophosphatidic acid. *J Biol Chem*. 2007;282:3403-12.
- ❖ Park YD, Kim YS, Jung YM, Lee SI, Lee YM, Bang JB, Kim EC. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide regulates interleukin (IL)-17 and

IL-23 expression via SIRT1 modulation in human periodontal ligament cells. *Cytokine*. 2012;60:284-93.

❖ Perry RT, Halsey NA. The clinical significance of measles: a review. *J Infect Dis*. 2004;189 Suppl 1:S4-16.

❖ Plemper RK, Brindley MA, Iorio RM. Structural and mechanistic studies of measles virus illuminate paramyxovirus entry. *PLoS Pathog*. 2011;7:e1002058.

❖ Plemper RK, Snyder JP. Measles control-can measles virus inhibitors make a difference?. *Curr Opin Investig Drugs*. 2009;10:811-20.

❖ Quarles LD, Yohay DA, Lever LW, Caton R, Wenstrup RJ. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. *J Bone Miner Res*. 1992; 7:683-92.

❖ Racaniello V. *Virology*. An exit strategy for measles virus. *Science*. 2011;334:1650-1.

❖ Rached MT, Kode A, Xu L, Yoshikawa Y, Paik JH, Depinho RA, Kousteni S. FoxO1 is a positive regulator of bone formation by favoring protein synthesis and resistance to oxidative stress in osteoblasts. *Cell Metab*. 2010;11:147-60.

❖ Radoshitzky SR, Abraham J, Spiropoulou CF, Kuhn JH, Nguyen D, Li W, Nagel J, Schmidt PJ, Nunberg JH, Andrews NC, Farzan M, Choe H. Transferrin receptor 1 is a cellular receptor for New World haemorrhagic fever arenaviruses. *Nature*. 2007;446:92-6.

❖ Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol*. 1998;50:413-92.

❖ Rath B, Nam J, Knobloch TJ, Lannutti JJ, Agarwal S. Compressive forces induce osteogenic gene expression in calvarial osteoblasts. *J Biomech*. 2008; 41:1095-103.

❖ Reuter D, Schneider-Schaulies J. Measles virus infection of the CNS: human disease, animal models, and approaches to therapy. *Med Microbiol Immunol*. 2010;199:261-71.

❖ Roberts SS, Miller RK, Jones JK, Lindsay KL, Greene MF, Maddrey WC, Williams IT, Liu J, Spiegel RJ. The Ribavirin Pregnancy Registry: Findings

after 5 years of enrollment, 2003-2009. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2010;88:551-9

❖ Romanello M, Codognotto A, Bicego M, Pines A, Tell G, D'Andrea P. Autocrine/paracrine stimulation of purinergic receptors in osteoblasts: contribution of vesicular ATP release. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 331:1429-38.

❖ Romanello M, Pani B, Bicego M, D'Andrea P. Mechanically induced ATP release from human osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 21: 289:1275-81.

❖ Sabattini MS, Monath TP, Mitchell CJ, Daffner JF, Bowen GS, Pauli R, Contigiani MS. Arbovirus investigations in Argentina, 1977-1980. I. Historical aspects and description of study sites. *Am J Trop Med Hyg.* 1985;34:937-44.

❖ Sabella C. Measles: not just a childhood rash. *Cleve Clin J Med.* 2010;77:207-13.

❖ Sanchez A, Pifat DY, Kenyon RH, Peters CJ, McCormick JB, Kiley MP. Junin virus monoclonal antibodies: characterization and cross-reactivity with other arenaviruses. *J Gen Virol.* 1989;70:1125-32.

❖ Sato H, Yoneda M, Honda T, Kai C. Morbillivirus receptors and tropism: multiple pathways for infection. *Front Microbiol.* 2012;3:75.

❖ Schneider-Schaulies J, Dunster LM, Schwartz-Albiez R, Krohne G, ter Meulen V. Physical association of moesin and CD46 as a receptor complex for measles virus. *J Virol* 1995;69:2248-56.

❖ Schöfl C, Cuthbertson KS, Walsh CA, Mayne C, Cobbold P, von zur Mühlen A, Hesch RD, Gallagher JA. Evidence for P2-purinoreceptors on human osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res.* 1992;7:485-91.

❖ Schrauwen I, Thys M, Vanderstraeten K, Franssen E, Dieltjens N, Huyghe JR, Ealy M, Claustres M, Cremers CR, Dhooge I, Declau F, Van de Heyning P, Vincent R, Somers T, Offeciers E, Smith RJ, Van Camp G. Association of bone morphogenetic proteins with otosclerosis. *J Bone Miner Res.* 2008;23:507-16.

❖ Schrauwen I, Van Camp G. The etiology of otosclerosis: a combination of genes and environment. *Laryngoscope.* 2010;120:1195-202.

- ❖ Schuknecht HF, Gacek MR. Cochlear pathology in presbycusis. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1993;102:1-16.
- ❖ Scodelaro Bilbao P, Boland R, Santillán G. ATP modulates transcription factors through P2Y2 and P2Y4 receptors via PKC/MAPKs and PKC/Src pathways in MCF-7 cells. *Arch Biochem Biophys.* 2010; 494:7-14.
- ❖ Senta H, Park H, Bergeron E, Drevelle O, Fong D, Leblanc E, Cabana F, Roux S, Grenier G, Faucheux N. Cell responses to bone morphogenetic proteins and peptides derived from them: biomedical applications and limitations. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009; 20:213-22.
- ❖ Shen B, Wei A, Whittaker S, Williams LA, Tao H, Ma DD, Diwan AD. The role of BMP-7 in chondrogenic and osteogenic differentiation of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells in vitro. *J Cell Biochem.* 2010; 109:406-16.
- ❖ Shiffman ML. What future for ribavirin? *Liver Int.* 2009;1:68-73.
- ❖ Shimegi S. ATP and adenosine act as a mitogen for osteoblast-like cells MC3T3-E1. *Calcif Tissue Int.* 1996; 58:109-13.
- ❖ Sila-Asna M, Bunyaratvej A, Maeda S, Kitaguchi H, Bunyaratavej N. Osteoblast differentiation and bone formation gene expression in strontium-inducing bone marrow mesenchymal stem cell. *Kobe J Med Sci.* 2007; 53:25-35.
- ❖ Sowa H, Kaji H, Iu MF, Tsukamoto T, Sugimoto T, Chihara K. Parathyroid hormone-Smad3 axis exerts anti-apoptotic action and augments anabolic action of transforming growth factor beta in osteoblasts. *J Biol Chem.* 2003;278:52240-52.
- ❖ Stankovic KM, Adachi O, Tsuji K, Kristiansen AG, Adams JC, Rosen V, McKenna MJ. Differences in gene expression between the otic capsule and other bones. *Hear Res.* 2010;265:83-9.
- ❖ Streeter DG, Simon LN, Robins RK, Miller JP. The phosphorylation of ribavirin by deoxyadenosine kinase from rat liver. Differentiation between adenosine and deoxyadenosine kinase. *Biochemistry.* 1974;13:4543-9.
- ❖ Styrkarsdottir U, Cazier JB, Kong A, Rolfsson O, Larsen H, Bjarnadottir E, Johannsdottir VD, Sigurdardottir MS, Bagger Y, Christiansen C, Reynisdottir I, Grant SF, Jonasson K, Frigge ML, Gulcher JR, Sigurdsson G, Stefansson K.

Linkage of osteoporosis to chromosome 20p12 and association to BMP2. *PLoS Biol.* 2003; 1: E69.

❖ Tanaka T, Oki S, Muro S, Tanaka K, Hashimoto J. A case of hepatitis C-associated osteosclerosis in an elderly Japanese man. *Endocr J.* 2006;53:393-9.

❖ Tanno M, Furukawa KI, Ueyama K, Harata S, Motomura S. Uniaxial cyclic stretch induces osteogenic differentiation and synthesis of bone morphogenetic proteins of spinal ligament cells derived from patients with ossification of the posterior longitudinal ligaments. *Bone.* 2003; 33:475-84.

❖ Thys M, Schrauwen I, Vanderstraeten K, Janssens K, Dieltjens N, Van Den Bogaert K, Franssen E, Chen W, Ealy M, Claustres M, Cremers CR, Dhooge I, Declau F, Claes J, Van de Heyning P, Vincent R, Somers T, Offeciers E, Smith RJ, Van Camp G. The coding polymorphism T263I in TGF-beta1 is associated with otosclerosis in two independent populations. *Hum Mol Genet.* 2007;16:2021-30.

❖ Triant VA, Brown TT, Lee H, Grinspoon SK. Fracture prevalence among human immunodeficiency virus (HIV)-infected versus non-HIV-infected patients in a large U.S. healthcare system. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:3499-504.

❖ Tseng WP, Yang SN, Lai CH, Tang CH. Hypoxia induces BMP-2 expression via ILK, Akt, mTOR, and HIF-1 pathways in osteoblasts. *J Cell Physiol.* 2010; 223:810-8.

❖ Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Cox K, Kakar S, Gerstenfeld L, Einhorn T, Tabin CJ, Rosen V. BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nat Genet.* 2006;38:1424-9.

❖ Tsuji K, Cox K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Tabin CJ, Rosen V. BMP4 is dispensable for skeletogenesis and fracture-healing in the limb. *J Bone Joint Surg Am.* 2008; 90 Suppl 1:14-8.

❖ Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science.* 1965; 150:893-9.

❖ Valvassori GE. The radiological diagnosis of acoustic neuromas. *Arch Otolaryngol.* 1966;83:582-7.

- ❖ Van Den Bogaert K, Govaerts PJ, De Leenheer EM, Schatteman I, Verstreken M, Chen W, Declau F, Cremers CW, Van De Heyning PH, Offeciers FE, Somers T, Smith RJ, Van Camp G. Otosclerosis: a genetically heterogeneous disease involving at least three different genes. *Bone*. 2002;30:624-30.
- ❖ van der Horst G, van Bezooijen RL, Deckers MM, Hoogendam J, Visser A, Löwik CW, Karperien M. Differentiation of murine preosteoblastic KS483 cells depends on autocrine bone morphogenetic protein signaling during all phases of osteoblast formation. *Bone*. 2002; 31:661-9.
- ❖ Vezza AC, Clewley JP, Gard GP, Abraham NZ, Compans RW, Bishop DH. Virion RNA species of the arenaviruses Pichinde, Tacaribe, and Tamiami. *J Virol*. 1978;26:485-97.
- ❖ Vogel, P., W. M. Kell, D. L. Fritz, M. D. Parker, and R. J. Schoepp. Early events in the pathogenesis of eastern equine encephalitis virus in mice. *Am J Pathol*. 2005;166:159-71.
- ❖ von Kügelgen I. Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol Ther*. 2006; 110:415-32.
- ❖ Vukicevic S, Helder MN, Luyten FP. Developing human lung and kidney are major sites for synthesis of bone morphogenetic protein-3 (osteogenin). *J Histochem Cytochem*. 1994;42:869-75.
- ❖ Wade-Gueye NM, Boudiffa M, Vanden-Bossche A, Laroche N, Aubin JE, Vico L, Lafage-Proust MH, Malaval L. Absence of bone sialoprotein BSP impairs primary bone formation and resorption: the marrow ablation model under PTH challenge. *Bone* 2012;50:1064-73.
- ❖ Wang L, Zhang X, Guo Y, Chen X, Li R, Liu L, Shi C, Guo C, Zhang Y. Involvement of BMPs/Smad Signaling Pathway in Mechanical Response in Osteoblasts Cellular Physiology. *Cell Physiol Biochem*. 2010; 26:1093-1102.
- ❖ Wei A, Brisby H, Chung SA, Diwan AD. Bone morphogenetic protein-7 protects human intervertebral disc cells in vitro from apoptosis. *Spine J*. 2008; 8:466-74.
- ❖ Weissenbacher MC, Avila MM, Calello MA, Merani MS, McCormick JB, Rodriguez M. Effect of ribavirin and immune serum on Junin virus-infected primates. *Med Microbiol Immunol*. 1986;175:183-6.

- ❖ WHO, Measles. Fact sheet 286, 2012. World Health Organization Media Centre <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs286/en/>.
- ❖ Wichmann O, Hellenbrand W, Sagebiel D, Santibanez S, Ahlemeyer G, Vogt G, Siedler A, van Treeck U. Large measles outbreak at a German public school, 2006. *Pediatr Infect Dis J*. 2007;26:782-6.
- ❖ Wiet RJ. Acoustic neuroma. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1991;104:282.
- ❖ Wildman SS, Unwin RJ, King BF. Extended pharmacological profiles of rat P2Y2 and rat P2Y4 receptors and their sensitivity to extracellular H⁺ and Zn²⁺ ions. *Br J Pharmacol*. 2003;140:1177-86.
- ❖ Womack JA, Goulet JL, Gibert C, Brandt C, Chang CC, Gulanski B, Fraenkel L, Mattocks K, Rimland D, Rodriguez-Barradas MC, Tate J, Yin MT, Justice AC; Veterans Aging Cohort Study Project Team. Increased risk of fragility fractures among HIV infected compared to uninfected male veterans. *PLoS One*. 2011;6:e17217.
- ❖ Wu JB, Fong YC, Tsai HY, Chen YF, Tsuzuki M, Tang CH. Naringin-induced bone morphogenetic protein-2 expression via PI3K, Akt, c-Fos/c-Jun and AP-1 pathway in osteoblasts. *Eur J Pharmacol*. 2008; 588:333-41.
- ❖ Yang J, Zhang X, Wang W, Liu J. Insulin stimulates osteoblast proliferation and differentiation through ERK and PI3K in MG-63 cells. *Cell Biochem Funct*. 2010;28:334-41.
- ❖ Yang L, Hai Y, Zhou J. Osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand expression during human marrow stromal cell differentiation and their effect on osteoclast formation. *Chin Med J*. 2011; 124:2033-7.
- ❖ Yonezawa T, Lee JW, Hibino A, Asai M, Hojo H, Cha BY, Teruya T, Nagai K, Chung UI, Yagasaki K, Woo JT. Harmine promotes osteoblast differentiation through bone morphogenetic protein signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;409:260-5.
- ❖ You J, Jacobs CR, Steinberg TH, Donahue HJ. P2Y purinoceptors are responsible for oscillatory fluid flow-induced intracellular calcium mobilization in osteoblastic cells. *J Biol Chem*. 2002; 277:48724-9.
- ❖ Young B, Dao CN, Buchacz K, Baker R, Brooks JT; HIV Outpatient Study (HOPS) Investigators. Increased rates of bone fracture among HIV-

infected persons in the HIV Outpatient Study (HOPS) compared with the US general population, 2000-2006. *Clin Infect Dis*. 2011;52:1061-8.

- ❖ Yu H, Ferrier J. Osteoblast-like cells have a variable mixed population of purino/nucleotide receptors. *FEBS Lett*. 1993; 328:209-14.
- ❖ Zehnder AF, Kristiansen AG, Adams JC, et al. Osteoprotegerin in the inner ear may inhibit bone remodeling in the otic capsule. *Laryngoscope*. 2005;115:172–177.
- ❖ Zehnder AF, Kristiansen AG, Adams JC, Kujawa SG, Merchant SN, McKenna MJ. Osteoprotegerin knockout mice demonstrate abnormal remodeling of the otic capsule and progressive hearing loss. *Laryngoscope*. 2006;116:201-6.
- ❖ Zhang P, Wu Y, Jiang Z, Jiang L, Fang B. Osteogenic response of mesenchymal stem cells to continuous mechanical strain is dependent on ERK1/2-Runx2 signaling. *Int J Mol Med*. 2012;29:1083-9.
- ❖ Zhang, Y., C. W. Burke, K. D. Ryman, and W. B. Klimstra. Identification and characterization of interferon-induced proteins that inhibit alphavirus replication. *J. Virol*. 2007;81:11246-55.
- ❖ Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2000; 362:299-309.