

La alta afinidad de los bisfosfonatos (BPs) por la hidroxiapatita del hueso y la capacidad que tienen para inhibir la resorción ósea hace que sean el medicamento de elección para la prevención y el tratamiento de enfermedades donde la actividad osteoclástica se encuentra exacerbada. Sin embargo, el mecanismo de acción preciso de los BPs, principalmente en osteoblastos, aún no ha sido completamente elucidado. En el presente trabajo de tesis se investigó la existencia de una entidad receptora para el amino-BP Alendronato (ALN) en células osteoblásticas ROS 17/2.8, a partir del cual se induce un mecanismo de transducción de señales intracelulares. Además, se estudió la modulación por ALN de las cascadas de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), y su participación en la proliferación de estas células. Los estudios realizados demuestran que las células osteoblásticas presentan un sitio de unión específico para el ALN, que es reversible, saturable y de alta afinidad. Mediante ensayos de ligado en células (HeLa) que no expresan conexina 43 (Cx43), se determinó que esta proteína no es necesaria para la unión del BP a la célula. Además, el ligado específico en osteoblastos cuya Cx43 basal se trató con desacoplantes de hemicanales demostró que la formación del conexón tampoco es necesaria para la unión del BP a la célula. Adicionalmente, se comprobó en ambas líneas celulares que el BP es capaz de ingresar,

por un mecanismo aún no estudiado, observándose mayor distribución en citoplasma y región perinuclear. El desplazamiento de ALN ligado observado en presencia de sustratos de fosfatasa, evidenció a estas enzimas como posibles moléculas blanco de BP. A su vez, se demostró por primera vez la expresión basal de proteínas tirosina fosfatasa (PTPs) receptoras de membrana y citoplasmáticas en osteoblastos y se observó que ALN inhibió la actividad de todas las PTPs estudiadas, al igual que el conocido inhibidor de PTPs, ortovanadato. Tratamientos a tiempos cortos con ALN promovieron la fosforilación de las MAPKs ERK1/2, ERK5, p38 y p46 JNK, en forma dependiente del tiempo. De la misma manera que los inhibidores de fosfatasa, ortovanadato y fluoruro de sodio, el BP produjo un aumento en la proliferación, tanto de células ROS 17/2.8 como de aquellas que no expresan Cx43, a 48 h de tratamiento en forma dependiente de la dosis. Estos resultados en conjunto indican que si bien esta proteína es requerida en la acción anti-apoptótica del BP en osteocitos y osteoblastos según estudios previos, no es necesaria para el ligando de ALN a la célula como tampoco para su efecto proliferativo. Los resultados presentados en este trabajo de tesis son aportes originales al conocimiento del mecanismo de acción de los amino-BPs en células osteoblásticas y podrían ser de relevancia para la mejora de las terapias preventivas de enfermedades metabólicas óseas frecuentes.

The high affinity of bisphosphonates (BPs) for hydroxyapatite and their ability to inhibit bone resorption makes them the drug widely used in the clinic for the prevention and treatment of diseases in which osteoclast activity is exacerbated. However, the precise mechanism of action of BPs, particularly in osteoblasts, has not yet been completely understood. In this thesis work it was investigated the existence of a receptor entity for the amino-BP alendronate (ALN) in ROS 17/2.8 osteoblastic cells, from which it induces a mechanism of intracellular signal transduction. In addition, the modulation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) signaling pathways induced by ALN and their involvement in the proliferation of osteoblasts were studied.

The results reported here provide strong evidences that osteoblastic cells present a specific binding site, which is reversible and saturable, with high affinity for ALN. Binding assays in cells (HeLa) that do not express connexin 43 (Cx43), demonstrated that this protein is not necessary for BP binding to the cell. Furthermore, specific ALN binding to osteoblasts treated with agents that disassemble Cx43 hemichannels showed that the pore formation is not either required for BP binding to the cell. Additionally, both cell lines internalized ALN from solution, by a mechanism not yet studied, showing a wide distribution in cytosol and peri-nuclear region.

The displacement of ALN bound to ROS 17/2.8 cells by phosphatases substrates, suggests that these enzymes may be molecular targets. Moreover, it was demonstrated for the first time the basal expression of cytoplasmic and receptor-like protein tyrosine phosphatase (PTPs) in osteoblasts. Additionally, like the most frequently used PTP inhibitor, orthovanadate; ALN inhibited the phosphatase activity of all the PTPs evaluated. Short-term treatment with BP increased phosphorylation of ERK1/2, ERK5, p38 and p46 JNK MAPKs in a time-dependent manner.

Like the PTPs inhibitors, orthovanadate and sodium fluoride, the BP induced an increase in osteoblastic cells proliferation, as well as in cells that do not express Cx43, in a dose-dependent manner after 48 h of treatment. These results altogether indicate that Cx43 is not necessary for the BP binding to the cell and the proliferative effect, even though this protein is required for the antiapoptotic action of ALN on osteoblasts and osteocytes. The results presented in this thesis work are original contributions to the knowledge of amino-BP mechanism of action on osteoblastic cells and may be of relevance to the improvement of the preventive therapies applied for common bone diseases.